

UNTERSUCHUNGEN ZUR  
SYNCHRONISATION DER DNA-SYNTHESE  
IN DER REGENERIERENDEN RATTENLEBER  
NACH HYDROXYHARNSTOFF-DAUERBEHANDLUNG

Gerd Iseler

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT  
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Direktor: Prof.Dr.M.EDER

---

UNTERSUCHUNGEN ZUR  
SYNCHRONISATION DER DNA-SYNTHESE  
IN DER REGENERIERENDEN RATTELEBER  
NACH HYDROXYHARNSTOFF-DAUERBEHANDLUNG

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Gerd I s e l e r  
aus Einbeck

München 1977

Berichterstatter: Prof. Dr. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Max Eder

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.6.1977



## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                                                                  | 1     |
| 2. Material und Methode                                                                                                        | 6     |
| 2.1. Versuchstiere und Operationsmethoden                                                                                      | 6     |
| 2.2. Behandlung mit HU                                                                                                         | 6     |
| 2.2.1. Infusionsapparatur                                                                                                      | 6     |
| 2.2.2. Vorbereitung der Ratten für die Dauerinfusionen                                                                         | 7     |
| 2.2.3. Anlegen der Infusionen                                                                                                  | 8     |
| 2.2.4. Beendigung der Infusionen                                                                                               | 9     |
| 2.2.5. Dosierung des HU                                                                                                        | 11    |
| 2.2.5.1. Herstellung der HU-Lösungen                                                                                           | 11    |
| 2.2.5.2. Vorinjektion von HU                                                                                                   | 12    |
| 2.2.5.3. Dauerinfusionen von HU                                                                                                | 12    |
| 2.3. Markierung der DNA-synthetisierenden Zellen mit $^3\text{H}$ -TdR                                                         | 13    |
| 2.3.1. Injektion von $^3\text{H}$ -TdR                                                                                         | 13    |
| 2.3.2. Dauerinfusionen von $^3\text{H}$ -TdR                                                                                   | 14    |
| 2.4. Versuchsbeendigung                                                                                                        | 15    |
| 2.5. Autoradiographie                                                                                                          | 15    |
| 2.6. Bestimmung der Spezifischen Aktivität der DNA                                                                             | 17    |
| 2.7. Bestimmung der Radioaktivität im säureunlöslichen Präzipitat                                                              | 19    |
| 2.8. Berechnung der DNA-Syntheserate                                                                                           | 22    |
| 3. Ergebnisse                                                                                                                  | 28    |
| 3.1. Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener HU-Konzentrationen auf den $^3\text{H}$ -TdR-Einbau der regenerierenden Rattenleber | 28    |

|                                                                                                                              | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.2. Kinetik der DNA-Synthese in der Leber<br>als Funktion des Zeitintervalls nach HU-<br>Infusionen unterschiedlicher Dauer | 29    |
| 3.2.1. Infusionsdauer: 14. - 24,5. Stunde nach<br>2/3-Hepatektomie (10,5 Stunden)                                            | 30    |
| 3.2.2. Infusionsdauer: 14. - 32. Stunde nach<br>2/3-Hepatektomie (18 Stunden)                                                | 31    |
| 3.2.3. Infusionsdauer: 14. - 40. Stunde nach<br>2/3-Hepatektomie (26 Stunden)                                                | 32    |
| 3.2.4. Infusionsdauer: 14. - 44. Stunde nach<br>2/3-Hepatektomie (30 Stunden)                                                | 33    |
| 3.3. Beziehung zwischen HU-Infusionsdauer<br>und Synchronisationsgrad der Leber-<br>zellen                                   | 34    |
| 3.4. <sup>3</sup> H-TdR-Einbau der regenerierenden<br>Leber und ihrer Zellkompartimente nach<br>25stündigen HU-Infusionen    | 37    |
| 3.5. Untersuchungen zur Toxizität von<br>HU-Dauerinfusionen                                                                  | 41    |
| 4. Diskussion                                                                                                                | 57    |
| 5. Zusammenfassung                                                                                                           | 78    |
| 6. Literatur                                                                                                                 | 80    |

# Abkürzungen

|                             |                                                                         |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| HU                          | Hydroxyharnstoff                                                        |
| $^3\text{H-TdR}$            | 6 - $^3\text{H}$ - Thymidin                                             |
| $\text{I}_b$                | Markierungsindex der Bindegewebszellen                                  |
| $\text{I}_p$                | Markierungsindex der Parenchymzellkerne                                 |
| i.p.                        | intraperitoneal                                                         |
| i.v.                        | intravenös                                                              |
| $\text{K}_b$                | Anzahl der radioaktiv-markierten Bindegewebszellen                      |
| $\text{K}_p$                | Anzahl der radioaktiv-markierten Parenchymzellkerne                     |
| KG                          | Körpergewicht                                                           |
| p.Hep.                      | nach Zweidrittelhepatektomie                                            |
| p.Inf.                      | nach Infusionsende                                                      |
| Spez.Akt.d.DNA <sub>b</sub> | Spezifische Aktivität der radioaktiv-markierten Bindegewebszellen       |
| Spez.Akt.d.DNA <sub>L</sub> | Spezifische Aktivität der DNA der Leber                                 |
| Spez.Akt.d.DNA <sub>p</sub> | Spezifische Aktivität der radioaktiv-markierten Leberparenchymzellkerne |
| T                           | Tötungszeitpunkt                                                        |

Material und Firmen

|                                                        |                                                                                                  |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Autoradiographie-<br>material                          | Kodak, Stripping Film AR. 10,<br>Kodak AG, Stuttgart<br>und Ilford K2 Emulsion,<br>Ilford, Essex |
| Gelatinekapseln                                        | No 5,<br>Park-Davis, Detroit                                                                     |
| Hochfrequenz-Vakuum-<br>prüfgerät                      | Leibold VP 23                                                                                    |
| $^3\text{H}$ -Thymidin                                 | 6 - $^3\text{H}$ - Thymidin, 5 Ci/mMol,<br>The Radiochemical Centre, Amersham                    |
| Hydroxyharnstoff                                       | HU reinst,<br>Serva Feinbiochemika, Heidelberg                                                   |
| Kalbsthymus-DNA                                        | Nr. 18560,<br>Serva Feinbiochemika, Heidelberg                                                   |
| Mikroskop                                              | Ortholux,<br>Leitz, Wetzlar                                                                      |
| Perfusor IV                                            | Braun, Melsungen                                                                                 |
| Perfusor-Besteck                                       | Nr. 72500,<br>Braun, Melsungen                                                                   |
| Perfusor-Infusions-<br>leitungen                       | Nr. 72295,<br>Braun, Melsungen                                                                   |
| Hansaplast                                             | Beiersdorf, Hamburg                                                                              |
| Rückstandslos ver-<br>brennendes Filterpapier          | Selecta, Schwarzband<br>Schleicher & Schüll, Einbeck                                             |
| Spektralphotometer                                     | Beckmann DU G-4700<br>Beckmann Instruments, München                                              |
| Szintillations-<br>zähler                              | Tricarb 3214,<br>Packard Instrument<br>Downers Grove, Ill.                                       |
| Standardproben für<br>$^3\text{H}$ -Thymidin-Aktivität | Packard Instrument,<br>Downers Grove, Ill.                                                       |

## 1. Einleitung

Zur Untersuchung Zellzyklusphasen-spezifischer Vorgänge eignen sich synchron wachsende Zellpopulationen. Nur in wenigen Zellsystemen erfolgt das Wachstum in synchronen Teilungsschritten, so zum Beispiel bei dem Schleimpilz *Physarum Polycephalum*. Seine natürliche Teilungssynchronie wurde als Modellsystem für Untersuchungen zur Regulation bestimmter Zellzyklusphasen verwendet (45). Mammalierzellen zeigen dagegen keine natürliche Synchronie des Zellzyklus. In den letzten Jahren wurde jedoch häufig versucht, eine artifizielle Synchronie einzelner Zellzyklusphasen zu erreichen. An Zellkulturen hat sich die Synchronisation durch mechanische Isolation in der Mitose befindlicher Zellen bewährt (51). Eine andere Möglichkeit besteht in der temporären pharmakologischen Hemmung phasengebundener Reaktionen, um Zellen in einem definierten Abschnitt des Zellzyklus zu akkumulieren. Nach Aufhebung des Blocks durchlaufen sie in höherer Synchronie die folgende Zellzyklusphase. In HEP-1- und HeLa-Zellkulturen wurde durch 5-Fluor-2-Deoxyuridin die Thymidin-Synthese gehemmt; Verarmung der Zellen an Thymidin hatte eine DNA-Syntheseinhibierung zur Folge. Protein- und RNA-Synthese waren kaum beeinflusst. Nach mehrstündiger Drogenbehandlung konnte durch exogenes Thymidin die DNA-Synthese induziert und eine partielle Synchronisation herbeigeführt werden (9, 43). Eine weitere für die Synchronisation verwendete Substanz ist Hydroxyharnstoff (HU), auf den die verschiedenen proliferierenden Gewebe jedoch nicht einheitlich reagierten. Am regelmäßigsten konnte die fast

immer und sofort mit der Applikation eintretende, reversible Hemmung der DNA-Synthese ohne wesentliche Beeinträchtigung der RNA- und Protein-Synthese beobachtet werden (30, 48, 58). Verantwortlich dafür ist wahrscheinlich HU selbst oder ein Metabolit mit der Gruppe  $-\overset{\text{H}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}-\text{N}$  und einem  $p_K = 8,4$  (17, 60). Daneben kam es besonders nach längerer Behandlungsdauer oder höheren Konzentrationen oft zur direkten DNA-Schädigung (8, 25), die meist nur begrenzte Zeit überlebt wurde. Eine entscheidende Rolle scheint dabei dem N-Carbamoyloxyurea zuzukommen, einem Oxydationsprodukt des HU (19).

Auch wenn Desoxyribonucleosid-Gemische (AdR, GdR, CdR) die HUinduzierte DNA-Synthesehemmung in HeLa-Zellen nur teilweise, aber nie vollständig aufhoben (59) und nur eine mäßige Steigerung der HU-gehemmten DNA-Synthese in einem Aszites-tumor bei Zugabe der vier Desoxyribonucleoside beobachtet wurde (56, 57), ist das Interferieren dieser Droge bei der Reduktion von Nucleotiden sehr wahrscheinlich. Welche Rolle die exogenen Purindesoxyribonucleoside nach ihrer Degradation zu den Purinen im Rahmen der anschließenden Reutilisation bei der noch bestehenden Hemmung vielleicht spielten (59), ist dabei ungewiß. Für eine Störung der Ribonucleotid-Reduktion zu den Desoxyribonucleotiden als eine mögliche HU-Wirkung sprach auch die irreversible Schädigung des aus E. coli gewonnenen, hoch gereinigten Ribonucleosid-Diphosphat-Systems in vitro (23). Der Wiederbeginn der DNA-Synthese auch bei nach Drogenauswaschung gehemmter Proteinsynthese durch Chloramphenicol in E. coli-Kulturen wies daraufhin,

daß dieses Ergebnis nicht uneingeschränkt auf intakte Zellen übertragen werden kann (44). Die Fähigkeit der Zelle, Enzyme zu reaktivieren, könnte dieses erklären (23).

HU ließ sich zur partiellen Synchronisation proliferierender Gewebe verwenden. Mehrstündiger Einsatz dieser Droge hemmte in HeLaS3-Kulturen nur die in der S-Phase befindlichen Zellen. Die übrigen passierten ungehindert den Zellzyklus, um mit zunehmender Behandlungsdauer stärker an der  $G_1$ -S-Grenze aufzulaufen (30). Bei einer Einwirkungszeit von  $t_{G_1} + t_S$  lag die Grenze dieser Methode. Die Zellen sind wahrscheinlich wegen der Diskrepanz zwischen fortlaufender Protein- und RNA-Synthese einerseits und fehlender DNA-Synthese andererseits ("Unbalanced Growth") (43) nicht mehr lebensfähig; gleichzeitiger Einsatz eines Proteinsynthesehemmers (Cycloheximid) wirkte sich begünstigend auf das Überleben aus (22). In Hamsterzellkulturen wurde der Synchronisationseffekt verstärkt durch das Absterben der S-Phasenzellen schon bei Kurzzeitexposition mit niedrigen, gerade die DNA-Synthese hemmenden HU-Konzentrationen (48, 49). In HeLaS3-Zellkulturen wurde dazu die vierfache Dosis benötigt (21); jedoch blieb beim Überschreiten einer wirksamen Drogenkonzentration die Überlebensrate konstant, was mit dem alleinigen S-Phasenangriff begründet wird (25).

In vivo stellt die regenerierende Rattenleber nach Teilhepatektomie eine partiell synchronisierte Zellpopulation dar. Wegen des unterschiedlichen Proliferationsverhaltens der Zellen in den verschiedenen Lobulusabschnitten - periportale

Hepatocyten haben die S-Phase bereits durchlaufen, wenn zentral lokalisierte sich noch in  $G_1$  befinden (35) - liegt der Markierungsindex nach 2/3-Hepatektomie selten über 30-40% (34). Während sich eine subtotale Hepatektomie nicht zu einer Steigerung des Markierungsindex eignet (52), konnte eine Zunahme des Prozentsatzes gleichzeitig in der S-Phase befindlicher Hepatocyten durch praeoperative Allylformiatbehandlung erreicht werden. Die selektive Zerstörung der Lobulusperipherie wirkte als zusätzlicher Stimulus zur Proliferation (36). Eine einmalige HU-Injektion führte in der regenerierenden Rattenleber zu einer vorübergehenden Hemmung der DNA-Synthese, und auch der  $C^{14}$ -Glycineinbau in die Kernhistone sank gegenüber den Kontrollen. Die RNA-Synthese war nicht meßbar beeinflusst, wie auch keine Beeinträchtigung der Cytoplasma- und Kern-Proteinsynthese beobachtet wurde (55). Sechs und vierundzwanzig Stunden nach einer HU-Behandlung wurden keine Nekrosen in der regenerierenden Leber beobachtet, während fortlaufend proliferierende Gewebe (Dünndarmkrypten, Funktionszentren der Lymphknoten, Basalschicht des Zungenepithels, Knochenmark) derselben Tiere Schäden aufwiesen (10, 47). Trotz der unterschiedlichen Reaktion der verschiedenen Gewebe scheint HU auch in vivo ein wirksamer und für die Leber gut verträglicher DNA-Synthesehemmer zu sein.

Für die Halbwertszeit der Droge im Rattenorganismus wurde 65 Minuten bei einer Plasmakonzentration über  $150 \mu\text{g/ml}$  bestimmt und 38 Minuten, wenn sie unter  $100 \mu\text{g/ml}$  absank. Während höherer Konzentrationen wird für die Elimination des HU seine

renale Ausscheidung als überwiegend angenommen, bei niedrigen Konzentrationen die metabolische Umwandlung in Harnstoff (31), eine Reaktion, die in der Mitochondrienfraktion der Mäuseleber nachgewiesen wurde (7), aber auch in der Niere stattfinden soll (1). Die zur Synchronisation erforderliche niedrige Halbwertszeit ist damit gegeben.

Ein transplantables Rattenkarzinom reagierte auf HU-Behandlung mit unmittelbar nach Drogenverabreichung einsetzender, fast vollständiger Hemmung des  $^3\text{H}$ -TdR-Einbaus in die DNA. Nach Unterschreiten der hemmenden Konzentration im Organismus wurde eine 80-100%ige Steigerung des Markierungsindex der Tumorzellen gegenüber Kontrolltieren beobachtet. Eine zusätzliche Erhöhung gelang durch einen zweiten, nach definierter Zeit gesetzten Block (40).

Auf der Grundlage dieser Versuche zur Synchronisation in vitro und in vivo wurde die Wirkung einer HU-Dauerinfusion auf das Proliferationsverhalten von Leberzellen nach partieller Hepatektomie untersucht. Angestrebt wurde die Entwicklung eines synchron DNA-replizierenden Modellsystems normaler Zellen in vivo.

## 2. Material und Methode

### 2.1. Versuchstiere und Operationsmethoden

Männliche Wistarratten (AF-Han) eigener Zucht wurden in klimatisierten Tierställen bei normalem Licht-Dunkelrhythmus in Macrolonkäfigen gehalten. Sie erhielten Altromin<sup>R</sup>-Standard-Diät und Wasser ad libitum. Für die Versuche wurden Tiere mit einem Gewicht von 200-240 g verwendet. Die Ratten wurden in Äthernarkose entsprechend den Angaben von Higgins und Anderson (16) 2/3-hepatektomiert.

### 2.2. Behandlung mit HU

Zweck der HU-Dauerinfusion war die temporäre Inhibierung der DNA-Synthese in der regenerierenden Leber. Es war erforderlich, HU bereits zu einem Zeitpunkt p.Hep. zuzuführen, zu dem die G<sub>1</sub>-Phase der Leberzellen noch nicht abgeschlossen war, i.e. die Hepatocyten noch nicht in die DNA-Synthesephase eingetreten waren. Als geeignet erschien die 14. Stunde p.Hep., da für die hier verwendeten Ratten ein DNA-Synthesebeginn zwischen 15 und 18 Stunden p.Hep. nachgewiesen worden war (35).

#### 2.2. 1. Infusionsapparatur

Für die Dauerinfusion von HU wurden Perfusoren verwendet, die für die simultane Aufnahme von drei Spritzen geeignet sind und mit ihren variablen Vorschubgeschwindigkeiten

die Infusion auch geringer Flußraten ermöglichen. Nach Verbreitern der Spritzenhalterung in hauseigener Werkstatt konnten die Perfusoren mit fünf Perfusor-Spritzen bestückt werden. Sie wurden mit HU-Lösung gefüllt in den Perfusor eingespannt und mit Perfusor-Infusionsleitungen verbunden. Durch kurzzeitig hohen Vorlauf des Perfusors füllten sich die Leitungen, deren Rekord-Lok-Konus wegen eines möglichen Saugeffekts bis zur Koppelung an das Perfusor-Besteck auf dem Niveau der Spritze gehalten werden mußte. Anschließend arbeitete der Perfusor 15 Minuten mit dem für die Dauerinfusion gewählten Vorschub, bevor der Anschluß an das Perfusor-Besteck vorgenommen wurde.

## 2.2. 2. Vorbereitung der Ratten für die Dauerinfusionen

14 Stunden nach der Operation erhielten die Ratten eine einmalige Injektion von HU in die Schwanzvene und anschließend eine über variierte Intervalle laufende Dauerinfusion mit HU. Dazu wurden die narkotisierten Ratten einzeln in Macrolonkäfigen (22 x 17 x 12 cm) in Seitenlage gebracht und der Schwanz durch ein gummiarmiertes Loch in der Wand nahe dem Boden nach außen geführt (Abb. 1). Mit zwei schmalen Pflasterstreifen (a) wurde der Schwanz an seinem Ansatz in seitlicher Lage fixiert, um zu verhindern, daß sich das Tier beim Erwachen um seine Längsachse drehte. Dabei wurde beachtet, daß eine Stase in den Hautgefäßen durch zu kräftiges Verkleben vermieden wurde. Die Schwanzspitze wurde mit einem zweiten Pflasterstück (b) in Seitenlage provisorisch so festgeklebt, daß der dazwischenliegende Schwanzabschnitt gerade und straff lag. 4 cm hinter der

ersten Fixation wurde ein etwa 2 cm langer Hautschnitt neben der schwach sichtbaren Vene durchgeführt. Mit einer kleinen Schere wurde das Gefäß von peripher der Schnittlänge entsprechend freipräpariert, was möglichst schnell und vorsichtig geschah, um ein Thrombosieren oder Kollabieren der Vene zu vermeiden. Zur späteren Fixation der Infusionsnadel an den Schwanz wurde ein Pflasterstreifen (c) unmittelbar hinter der Wunde unter dem Schwanz bereitgelegt; ebenso erfolgte die endgültige Schwanzfixation bereits vor dem Legen der Infusionsnadel mit einem breiten Pflasterstreifen (d).

## 2.2. 3. Anlegen der Infusionen

Für die intravenöse Kanülierung wurde ein Perfusor-Besteck verwendet, dessen Plastikflügel abgeschnitten waren, um später eine bessere Fixierung zu ermöglichen. Es enthielt 0,89% sterile NaCl, ebenso wie die angeschlossene, nicht vollkommen gefüllte 1ml Tbc-Spritze. Unter Sicht wurde die Nadel in das Gefäß gelegt, wobei ein unmittelbar an der Punktionsstelle der Vene liegender Tupfer das während des Einstichs austretende Blut aufnahm, um freie Sicht zu gewährleisten. Bei vorsichtiger Aspiration mit der Tbc-Spritze kam es zum Reflux von Blut in den Infusionsschlauch, wenn sich die Nadel in intravasaler Position befand. Um bei der weiteren Manipulation jede unnötige Bewegung der Nadel zu vermeiden, wurde sie mit dem bereitliegenden Pflasterstreifen (c) fixiert, der Schlauch nahe dem Anschlußstück ebenfalls (e). Zwischen diesen beiden Befestigungspunkten lag der Schlauch spannungsfrei. Mit einer zweiten Tbc-Spritze

wurde eine Vorinjektion von HU gegeben und eine dem doppelten Volumen des Perfusorbestecks entsprechende Menge (0,3 ml) physiologischer Kochsalzlösung nachgespritzt. Dann wurde die Perfusor-Infusionsleitung angeschlossen und der Kolbenstand der zugehörigen Perfusor-Infusionsspritze (Fehler:  $\pm$  0,05 ml) sowie die Uhrzeit notiert. Der Wechsel am Anschlußstück (f) des Perfusorbestecks geschah luftfrei, bei Bedarf wurde es mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt. Das Zurückfließen größerer Blutmengen in das Perfusor-Besteck während der Umstöpselung mit der Gefahr einer Thrombosierung der Kanüle ließ sich durch vorübergehendes Abklemmen des Schlauchs vermeiden.

Ein Abdecken der Wunde erfolgte nicht, um eine Kompression des Gefäßes zu vermeiden. Verschorfung der offenen Hautwunde wirkte sich günstig auf den Infusionsverlauf aus. Starkes Nässen der Wunde besonders unmittelbar nach Legen der Nadel erwies sich oft als Wundsekretion.

#### 2.2. 4. Beendigung der Infusionen

Nach Notieren des Kolbenstandes und der Uhrzeit wurde zur Beendigung der Infusion und zur Kontrolle ihres Verlaufs 1 ml physiologische NaCl nachgespritzt. Meist ließ sich anschließend auch Blut aspirieren. Lag die Nadel paravenös, so war die auslaufende Kochsalzlösung ein eindeutiger Beweis für einen Fehler bei der Infusion. Diese abschließende Injektion und die Blutaspiration waren die Kriterien zur Beurteilung des Infusionsverlaufs. Nach einiger Übung verliefen 80-90% der gelegten Infusionen erfolgreich.

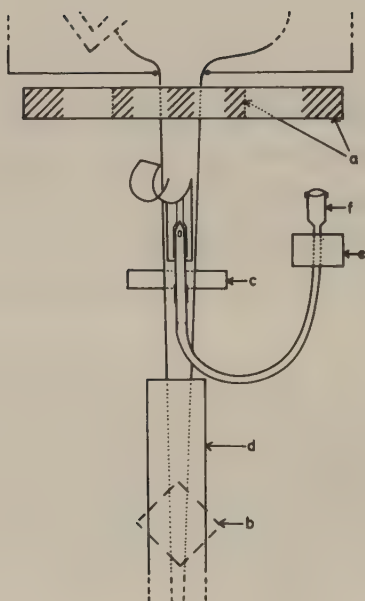


Abb. 1: Das Tier befindet sich narkotisiert in Seitenlage in einem Käfig. Sein Schwanz ist mit Pflasterstreifen befestigt und die Vene freipräpariert; die Infusionsnadel ist gelegt, aber noch nicht fixiert. a - e: Pflasterstreifen, f: Anschlußstück des Perfusorbestecks.

## 2.2. 5. Dosierung des HU

Die infundierte HU-Dosis sollte eine möglichst vollständige DNA-Synthesehemmung der regenerierenden Leber bewirken. Für einmalige i.v. Dosen von 500 mg HU/kg KG ( $6,58 \times 10^{-3}$  Mol/kg KG) war eine sehr starke Hemmwirkung eine Stunde nach der Gabe beschrieben worden (47). Weil sie auch nach 2 Stunden 40 Minuten noch nachzuweisen war (47), wurde bei Beginn der Versuche davon ausgegangen, daß stündliche Infusionen von  $5 \times 10^{-3}$  Mol HU/kg KG eine sehr gute DNA-Synthesehemmung der Leber bewirken würden.

### 2.2. 5.1. Herstellung der HU-Lösungen

HU wurde in der Originalverpackung ungelöst im Kühlschrank ( $4^{\circ}\text{C}$ ) aufbewahrt. Erst unmittelbar vor Anlegen der Infusion wurde nach erneuter Körpergewichtsbestimmung der Versuchstiere die benötigte Drogenmenge abgewogen, in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und bis zu ihrer Verwendung in einen Kühlschrank gestellt. Weil HU hygroskopisch ist, ließ sich auch durch möglichst kurzzeitiges Öffnen und sorgfältiges Verschließen des Vorratsgefäßes Einlagerung von Wasser sicherlich nicht vollständig vermeiden. Ohne quantitative analytische Methoden war der daraus resultierende Fehler nicht erfaßbar und wurde deshalb nicht berücksichtigt. Mit Zerfall der Droge während ihrer Lagerung im Kühlschrank oder durch ihre Erwärmung in einer Lösung auf Zimmertemperatur für höchstens 4 Stunden wurde nicht gerechnet. Die Cytotoxizität in Hamsterzellkulturen einer für 24 Stunden

auf 37°C erwärmten HU-Lösung unterschied sich jedenfalls nicht von der einer frisch angesetzten Lösung (49).

## 2.2. 5.2. Vorinjektion von HU

Bereits zu Beginn der HU-Behandlung mußte ein für die DNA-Synthese-Inhibition ausreichender Plasma-Spiegel an HU gesichert sein, um auch die ersten in die S-Phase eintretenden Hepatocyten am G<sub>1</sub>-S-Übergang blockieren zu können. Es wurde deshalb mit der HU-Dauerinfusion erst nach einer i.v. Vorinjektion von HU begonnen, die dem 1,35fachen der anschließend stündlich infundierten Menge entsprach. Die Konzentration der Injektionslösung war im Versuch zur Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener HU-Konzentrationen (3.1.) für die ersten 3 Tiere 1,34 molar und für das 4.-7. Tier 0,26 molar. In allen anderen Versuchen war die Konzentration 0,42 molar. Für das jeweilige Körpergewicht errechnete Mengen der Lösungen wurden unverdünnt i.v. injiziert.

## 2.2. 5.3. Dauerinfusionen von HU

Eingespannt in den Perfusor befanden sich die mit HU-Lösung gefüllten Spritzen während der Infusion in einem Kühltisch. Die Gummidichtung der Kühltischtür komprimierte die aus dem Kühltisch führenden Infusionsleitungen nur wenig, so daß während der Infusionen keine Veränderungen des Vorschubs zu beobachten waren. Die Infusionslösungen wurden aus kurz vor Infusionsbeginn zubereiteten Stammlösungen angesetzt. Die Stammlösungen im Versuch zur Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener HU-Konzen-

trationen (3.1.) waren für das 1.-3. Tier 2,19 molar und für das 4.-7. Tier 0,26 molar. In allen anderen Versuchen kamen Stammlösungen einer Konzentration von 0,63 molar zur Verwendung.

Bei Ansetzen der Infusionslösungen wurde den schwereren Tieren die errechnete größere Menge der HU-Stammlösung in die zugehörige Infusionsspritze pipettiert und dann eine entsprechend geringere Menge physiologischer Kochsalzlösung hinzugegeben, als es für die leichteren Tiere der Fall war. So enthielten schließlich alle Spritzen eines Perfusors das gleiche Volumen von Infusionslösungen dem jeweiligen Körpergewicht angepaßter Konzentrationen. Um die tatsächlich infundierte HU-Dosis kontrollieren zu können, wurde diese nach Versuchsende aus dem Körpergewicht der Versuchstiere, der Infusionszeit und dem Infusionsvolumen zurückerrechnet. Das Infusionsvolumen entsprach der Differenz des zu Infusionsbeginn und -ende abgelesenen Kolbenstandes der Infusionsspritze. Die Abweichung von der erwünschten Dosis betrug maximal  $\pm 3\%$ ; nur ein einziges Mal war durch Thrombosierung einer Kanüle die Versuchsserie nicht auswertbar.

### 2.3. Markierung der DNA-synthetisierenden Zellen mit $^3\text{H-TdR}$

Zur Darstellung der DNA-Synthese wurde den Tieren tritiummarkiertes Thymidin injiziert.

#### 2.3. 1. Injektion von $^3\text{H-TdR}$

Für die Pulsmarkierung wurde die bewährte Dosierung von

0,8  $\mu$ Ci/g KG verwendet (34, 35). Dabei war die Injektionslösung (0,2 mCi/ml) aus der Originalampulle (1 mCi/ml) durch Verdünnung mit 4 ml physiologischer Kochsalzlösung hergestellt worden. Der Zeitraum zwischen Infusionsende und i.p. injiziertem  $^3\text{H}$ -TdR war unterschiedlich und ist bei den Ergebnissen (3.) angegeben.

### 2.3. 2. Dauerinfusionen von $^3\text{H}$ -TdR

An der regenerierenden Rattenleber sind strahlentoxische Wirkungen beschrieben worden, wenn  $^3\text{H}$ -TdR in einer Dosis von 1  $\mu$ Ci/g Körpergewicht und mehr verabreicht wurde (13). Deshalb kam bei den Dauerinfusionen eine niedrigere Dosis von 0,2  $\mu$ Ci/g KG/h zum Einsatz. Sie genügte zur Erfassung der DNA-Synthese in der regenerierenden Leber. Sicherlich stellte sich jedoch mit der Infusionsdauer eine zunehmende Strahlenbelastung ein, die möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der Proliferation führte. Dieses mußte bei quantitativen Vergleichen mit den pulsmarkierten Tieren berücksichtigt werden.

Die Infusionslösungen, deren Konzentration mit dem Körpergewicht korrelierte, wurden aus Stammlösungen (0,2  $\mu$ Ci/ml) durch Verdünnen mit 0,89%iger NaCl in gleicher Weise wie für HU beschrieben angesetzt. Die Dauer der Infusion mit  $^3\text{H}$ -TdR ist im Versuch zur Untersuchung der Beziehung zwischen HU-Infusionsdauer und Synchronisationsgrad der Leberzellen (3.3.) notiert. Für das Anlegen und die Beendigung der  $^3\text{H}$ -TdR-Infusionen sowie für die Herrichtung der Infusionsapparatur galt dasselbe wie für HU-Infusionen.

#### 2.4. Versuchsbeendigung

Die Versuche wurden immer 60 Minuten nach i.p. Injektion der radioaktiven Lösung bzw. 25 Minuten nach Beendigung der  $^3\text{H}$ -TdR-Infusion durch Töten der Tiere zwischen zehn und dreizehn Uhr beendet. Für die Autoradiographie wurden die beiden Magen- und der Cavalappen in 10%igem Formol mit 0,1 mg inaktivem Thymidin pro ml fixiert. Zur Bestimmung der Spezifischen Aktivität der DNA und der Radioaktivität im Lebergewebe wurde der rechte Leberlappen in flüssigem Stickstoff gefroren und in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt. Fiel bei der Sektion eine Leber durch fettbedingte Gelbfärbung auf, so wurde das entsprechende Tier in den Tabellen mit einem g gekennzeichnet, wenn keine autoradiographische Untersuchung des Präparats erfolgte.

#### 2.5. Autoradiographie

Nach Einbettung der formolfixierten Leberlappen über eine aufsteigende Alkoholreihe (Wasser, Alkohol, Xylol) in Paraplast wurden 4  $\mu$  dicke Schnitte angefertigt. Auf gereinigte und mit Eiweißglyzerin beschichtete Objektträger gebracht, erfolgte anschließend die Entparafinierung der Schnitte in umgekehrter Folge. In einer Dunkelkammer wurden die Autoradiographiefilme aufgesetzt und bei 4°C für drei Wochen exponiert. Anschließend wurden die Präparate für 12 Minuten entwickelt und 25-30 Minuten fixiert. Nach Färbung mit Hämalaun und Eosin wurden die Präparate mit Eukitt ein-

gedeckt. Zur Auswertung stand ein Mikroskop mit Ölimmersionsobjektiv zur Verfügung, das eine 1000fache Vergrößerung ermöglichte. Fanden sich in einem Präparat ungewöhnlich viele Fettvakuolen oder Nekrosen, so ist das entsprechende Tier in den Tabellen mit einem f oder n hervorgehoben. Meist handelte es sich hierbei sicher um toxische Auswirkungen der Droge. In einem Fall war während der Teilhepatektomie eine versehentliche partielle Ligatur des venösen Abflusses der nicht resezierten Restleber notiert worden. Sie ist durch eine Klammer (n) markiert. In vielen Fällen war die Markierungsdichte der verschiedenen Leberlappen desselben Tieres unterschiedlich; der am stärksten markierte wurde verwendet. 3 x 1000 Hepatocytenkerne wurden in jedem Präparat meanderförmig ausgezählt, dabei markierte, unmarkierte und in der Mitose (nur Meta- und Anaphasen) befindliche unterschieden. Zweikernige Zellen, die in der Leber erwachsener Ratten zu 30% vertreten sind (2, 27), wurden als zwei einzelne Zellen gezählt. Aus den erhaltenen Werten erfolgte Berechnung des Markierungs- und Mitoseindex.

$$\text{Markierungsindex (\%)} = \frac{\text{markierte Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

$$\text{Mitoseindex (\%)} = \frac{\text{mitotische Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

Bei der Untersuchung des  $^3\text{H}$ -TdR-Einbaus der regenerierenden Leber und ihrer Zellkompartimente nach HU (3.4.) wurde der Versuch gemacht, stark und schwach markierte Kerne zu unterscheiden. Die Körnchendichte der stark markierten entsprach

mindestens dem sechsfachen, die der schwach markierten mindestens dem dreifachen des Background. Ferner wurden bei diesen Versuchen 1000 Bindegewebszellen und die in allen drei Leberlappen auffindbaren, ein sichtbares Lumen umgrenzenden Gallengangszellen (maximal 400) ausgezählt und deren Markierungsindex bestimmt.

## 2.6. Bestimmung der Spezifischen Aktivität der DNA

Die Spezifische Aktivität der DNA entspricht dem Anteil der neu-synthetisierten, radioaktiv-markierten DNA an der gesamten DNA der Leber. Als Maß für die neu-synthetisierte DNA diente dabei die Radioaktivität, die auf eine definierte Menge der DNA der Leber bezogen wurde.

$$\text{Spez. Akt. d. DNA} = \frac{\text{Radioaktivität (cpm)}}{\text{DNA (mg)}}$$

Zu ihrer Bestimmung wurde der Anleitung von Munro und Fleck (26) folgend eine DNA-Extraktion (a) durchgeführt. In der so gewonnen DNA/Proteinfraktion erfolgte die DNA-Gehaltsbestimmung (b) mit der Diphenylamin-Methode nach Burton (6), wobei Kalbsthymus-DNA als Standard (c) diente. Die Radioaktivität (d) wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen, die Ergebnisse in Impulsen pro Minute und Milligramm DNA ausgedrückt (cpm/mg).

(a) Zur Extraktion der DNA erfolgte nach Auftauen des gefrorenen Lebergewebes mit einem Skalpell schabend eine grobe Trennung des Bindegewebes vom Leberparenchym. Aus dem letzteren wurde mit eisgekühltem, destillierten Wasser ein

Homogenat (1:20, g/Vol) hergestellt, von dem 5 ml mit 2,5 ml eisgekühlter 0,6n  $\text{HClO}_4$  gemischt und zehn Minuten im Eisbad stehen gelassen wurden. Kurzem Zentrifugieren der Probe (2100 rpm für 2 Minuten) und Abkippen des Überstandes (niedermolekulare, säurelösliche Fraktion) schloß sich zweimaliges Waschen des säureunlöslichen Präzipitats mit 0,2n  $\text{HClO}_4$  an.

Die Abtrennung der Lipidfraktion aus dem Präzipitat erfolgte durch zweimalige Einwirkung von je 5 ml 96%igen Äthanolis für fünf Minuten mit anschließendem Abzentrifugieren und Verwerfen des Überstandes.

Zur alkalischen RNA-Hydrolyse wurde dem Präzipitat 4 ml 0,3n KOH zugesetzt und für eine Stunde auf 37°C erwärmt. Fünfminütigem Abkühlen im Eisbad folgte Zugabe von 2,5 ml 1,2n  $\text{HClO}_4$ . Zehn Minuten später wurde kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zweimaliges Waschen mit 5 ml 0,2n  $\text{HClO}_4$  schloß sich an. Das Protein/DNA-Präzipitat wurde mit 5 ml 0,3n KOH bei 37°C gelöst und dann nach Zusatz von 12 ml 0,3n KOH mit A.dest. auf 50 ml aufgefüllt.

(b) Für die DNA-Gehaltsbestimmung wurden 2 ml der DNA-Lösung mit 4 ml frischer Diphenylamin-Reagenzlösung in einem Reagenzglas gemischt, das Reagenzglas mit einem Parafilmstreifen verschlossen und für 18 Stunden bei 30°C in einen Brutschrank gestellt. Die Extinktionsmessung der Probe gegen den Leerwert (17 ml 0,3n KOH mit A.dest. ad 50 ml) erfolgte mit einem Spektralphotometer bei 600 nm ( $d = 1$  cm). Die Diphenylamin-Reagenzlösung wurde direkt vor Gebrauch aus 100 ml Stammlösung (1,5 g Diphenylamin, 100 ml Eisessig,

1,5 ml Konz.  $H_2SO_4$ ) und 0,5 ml wässriger Acetaldehyd-lösung (16 mg/l) angesetzt.

(c) Die Standardlösungen wurden aus einer Stammlösung zubereitet, welche 5 mg Kalbsthymus-DNA gelöst in 20 ml 0,3n KOH enthielt. 5 ml dieser Lösung wurden mit 12 ml 0,3n KOH versetzt und mit A.dest. auf 50 ml aufgefüllt. Die Konzentrationen der hieraus durch Verdünnen mit 0,1n KOH gewonnenen Standardlösungen betrug 40, 80 und 160  $\mu$ g DNA/10 ml. Je 2 ml dieser Lösungen wurden mit 4 ml Diphenylamin-Reagenz versetzt und wie die Versuchsproben behandelt.

(d) Für die Radioaktivitätsbestimmung wurden 2 ml der DNA-Lösung in 15 ml Szintillator nach Bray (60 g Naphtalin, 4 g PPO-Packard, 0,2 g POPOP-Packard, 100 ml Methanol, 20 ml Äthylalkohol, Dioxan ad 1000 ml) gegeben und im Szintillationszähler (Kanal 1: 55%, 70-1000; Kanal 2: 55%, 460-1000) gemessen.

## 2.7. Bestimmung der Radioaktivität im säureunlöslichen Präzipitat

Das säureunlösliche Präzipitat wurde wie für die Extraktion der DNA beschrieben angefertigt. Dabei wurde auf eine Abtrennung der Lipidfraktion und die ihr folgenden Arbeitsgänge ebenso wie auf die Verwendung eines Eisbades verzichtet. Die Bestimmung der Radioaktivität im so erhaltenen Perchlor-säurepräzipitat erfolgte nach einer von Rabes beschriebenen Arbeitsweise zum Nachweis des Tritiums in organischem Gewebe mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationsmessung (34).

Dazu kam nach zweimaligem Waschen das säureunlösliche Präzipitat auf ein zuvor gewogenes (Wiegefehler:  $\pm 0,05$  mg), etwa  $1\text{ cm}^2$  großes Stück rückstandslos verbrennendes Filterpapier. Das Trocknen erfolgte in einem Brutschrank bei  $55^\circ\text{C}$  während 24 Stunden. Dann wurde die Probe mit Papier erneut gewogen, beides in eine Gelantinekapsel gegeben und unter Luftabschluß in einem Duranglas-Rundkolben (34) in reiner Sauerstoffatmosphäre vollständig verbrannt (e). Die Oxidationsprodukte wurden nach Schütteln des Kolbens in eine vor Versuchsbeginn einpipettierte Vorlageflüssigkeit (10 ml Methanol) aufgenommen. Ihre Radioaktivität (f) wurde im Szintillationszähler (Kanal 1: 77%, 70-100; Kanal 2: 77%, 600-1000) mit Hilfe von Standardproben (g) nach der Kanalverhältnis-Methode (34) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Zerfälle pro Minute und Milligramm Präzipitat nach Trocknung angegeben (dpm/mg).

(e) Die zur Verbrennung der Proben benutzten Duranglas-Rundkolben faßten 1 l. Sie besaßen einen Ansatzstutzen, der die Kühlung der Vorlageflüssigkeit im  $\text{CO}_2$ -Azeton-Kältebad ermöglichte, sowie an der gegenüberliegenden Seite einen Schliffstopfen. In den letzteren waren zwei Platindrähte eingeschmolzen, von denen der eine nach außen führte. Im Inneren berührte er ein am zweiten Draht befestigtes Platin-körbchen. Die Entzündung der in einen mit Methanol getränkten Filterpapierstreifen eingewickelten Probe erfolgte über den nach außen geführten Draht unter Verwendung eines Hochfrequenz-Vacuum-Prüfgerätes. Ein Stück des Filterpapiers war dabei zwischen diesen Draht und das Körbchen geklemmt.

(f) Zur Bestimmung der Radioaktivität in der Probe wurden nach Schütteln des Kolbens 5 ml der Vorlageflüssigkeit in 15 ml Bray-Szintillator pipettiert, die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen und auf das halbe Trockengewicht des Präzipitats bezogen. Nicht berücksichtigt wurden dabei das Volumen der Oxidationsprodukte, so daß alle errechneten Werte falsch zu niedrig sind. Der Fehler lag unter 2% und wurde vernachlässigt, zumal diese Methode neben der genaueren Bestimmung der Spezifischen Aktivität der DNA nur zur schnellen, überschlagsmäßigen Beurteilung eines Versuchs diente.

(g) Die Standardproben enthielten alle dieselbe, bekannte  $^3\text{H}$ -Aktivität, jedoch war der Löscheffekt unterschiedlich. Ihre Radioaktivität wurde mit den für die Versuchsproben verwendeten Kanaleinstellungen gemessen. Aus den in Kanal 1 gemessenen Impulsen und der bekannten Aktivität der Standardproben ließ sich der Prozentsatz der tatsächlichen Gesamtaktivität, der von diesem Kanal erfaßt wurde, ausrechnen (registrierte Impulszahl/tatsächliche Zerfälle  $\times 100$ ). Dieser wurde als Funktion des Kanalverhältnisses ( $K^1/K^2$ ) graphisch dargestellt. Aus der so erhaltenen Eichkurve ließ sich jeder Probe unbekannter Aktivität nach Bestimmung des Kanalverhältnisses ein Prozentsatz zuordnen, der die Berechnung ihrer tatsächlichen Gesamtaktivität aus den im Kanal 1 gemessenen Impulsen pro Minute ermöglichte. Rechenbeispiel an Hand des ersten Tieres des Versuchs über die Dosis-Wirkungsbeziehung des HU (3.1.):

In Kanal 1 wurden 10,5 cpm/mg Präzipitat nach Trocknung

bestimmt. Das Kanalverhältnis betrug  $K1/K2 = 5,31$ . Der Eichkurve war zu entnehmen, daß diesem Kanalverhältnis 6,3% der Gesamtaktivität entsprach:

$$\text{tatsächliche Zerfälle} \left( \frac{\text{dpm}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{registrierte Impulse} \left( \frac{\text{cpm}}{\text{mg}} \right)}{\text{Prozent der tatsächlichen Zerfälle}} \times 100\%$$

$$\frac{10,5}{6,3} \times 100 = 166,6 \approx 167$$

## 2.8. Berechnung der DNA-Syntheserate

Die DNA-Syntheserate soll einen Anhaltspunkt für den Umfang der DNA-Synthese in den Zellen einer definierten Zellpopulation bekannter Größe liefern. Sie läßt sich in unterschiedlicher Weise ermitteln. Hier wurde der Versuch gemacht, aus Spezifischer Aktivität der DNA und Markierungsindex die den radioaktiv-markierten Leberparenchymzellkernen zukommende Inkorporation von  $^3\text{H}$ -TdR zu errechnen. Dazu wurde vorausgesetzt, daß die DNA-Syntheserate proportional der Menge neu-synthetisierter, radioaktiv-markierter DNA und umgekehrt proportional der Größe der DNA-synthetisierenden Zellpopulation steigt. Als Maß für die Menge neu-synthetisierter DNA diente die im Labor bestimmte Spezifische Aktivität der DNA, während die Größe der DNA-synthetisierenden Zellpopulation durch ihren Markierungsindex festgelegt wurde. Der Markierungsindex der Parenchymzellkerne war bekannt, nicht jedoch die Spezifische Aktivität der DNA der radioaktiv-markierten Parenchymzellkerne. Sie wurde als Anteil der Spezifischen Aktivität der DNA der Leber berechnet, wobei Unterschiede zwischen Bindegewebs- und Parenchymzellen bezüglich ihrer

Anzahl DNA-synthetisierender Zellkerne, Populationsgröße und Ploidie zu berücksichtigen waren.

Zur Vereinfachung der Rechnung dienten folgende, nur eingeschränkt gültige Annahmen:

1. radioaktiv-markierte DNA befinde sich ausschließlich in der DNA von Bindegewebs- und Parenchymzellkernen,
2. in derselben Leberprobe sei der Gehalt radioaktiv-markierter DNA in den radioaktiv-markierten Parenchymzellkernen untereinander gleich,
- dasselbe gelte für Bindegewebszellen,
3. Leberparenchymzellkerne und Bindegewebszellkerne seien im Verhältnis 2:1 vertreten,
4. die Parenchymzellkerne seien tetraploid (15, 28), die Bindegewebszellkerne diploid,
5. der Umfang der DNA-Synthese eines radioaktiv-markierten Kerns sei direkt proportional seiner Ploidie.

Ausgangspunkt der Berechnung war die im Labor bestimmte Spezifische Aktivität der DNA der Leber, die den Anteil neu-synthetisierter, radioaktiv-markierter DNA an der gesamten DNA der Leber angibt. Befand sich nun die radioaktiv-markierte DNA ausschließlich in den DNA-synthetisierenden Parenchym- und Bindegewebszellkernen (Annahme 1), so verhielt sich die Spezifische Aktivität der DNA von der Leber (Spez. Akt.d.DNA<sub>L</sub>) zur Spezifischen Aktivität der DNA von den DNA-synthetisierenden Parenchymzellkernen (Spez. Akt.d.DNA<sub>p</sub>) wie die Summe aller DNA-synthetisierender Parenchym- ( $K_p$ ) und Bindegewebszellkerne ( $K_b$ ) zur Anzahl DNA-synthetisierender Parenchymzellkerne ( $K_p$ ).

$$\frac{\text{Spez. Akt. d. DNA}_L}{\text{Spez. Akt. d. DNA}_P} = \frac{K_p + K_b}{K_p}$$

Voraussetzung hierfür war allerdings, daß der Gehalt an neu-synthetisierter DNA in allen DNA-synthetisierenden Zellen derselben Population untereinander gleich sei (Annahme 2).

Die absoluten Zahlen der DNA-synthetisierenden Zellen waren nicht bekannt, jedoch verhalten sie sich direkt proportional zu ihren Markierungsindices (I).

$$\frac{\text{Spez. Akt. d. DNA}_L}{\text{Spez. Akt. d. DNA}_P} = \frac{I_p + I_b}{I_p}$$

Da die Population der Parenchymzellkerne doppelt so groß war wie die der Bindegewebszellkerne (Annahme 3), wurden die Markierungsindices der Parenchymzellen mit dem Faktor 2 multipliziert.

$$\frac{\text{Spez. Akt. d. DNA}_L}{\text{Spez. Akt. d. DNA}_P} = \frac{2 \times I_p + I_b}{2 \times I_p}$$

Waren ferner die Parenchymzellkerne tetraploid, die Bindegewebszellkerne diploid (Annahme 4) und wurde radioaktiv-markierte DNA proportional der Ploidie synthetisiert (Annahme 5), so war die Formel in gleicher Weise nochmals zu korrigieren.

$$\frac{\text{Spez. Akt. d. DNA}_L}{\text{Spez. Akt. d. DNA}_P} = \frac{4 \times I_p + I_b}{4 \times I_p}$$

Die Spezifische Aktivität der DNA in den radioaktiv-markierten Parenchymzellkernen betrug also:

$$(1) \text{ Spez. Akt. d. DNA}_p = \frac{4 \times I_p}{4 \times I_p + I_b} \times \text{Spez. Akt. d. DNA}_L$$

Sie gibt den Anteil neu-synthetisierter DNA der Leberparenchymzellkerne an der gesamten DNA dieser Zellen wieder.

Wie anfangs gesagt, ist die DNA-Syntheserate der Zellen einer Population um so größer, je weniger von ihnen DNA synthetisieren und je größer die ihnen zukommende Spezifische Aktivität der DNA ist. Bei der Auswertung der Autoradiographien wies unterschiedliche Silberkorndichte über den einzelnen Parenchymzellkernen der verschiedenen Präparate auf wechselnden Gehalt neu-synthetisierter DNA in den Kernen hin. Dies sollte bei der Berechnung der DNA-Syntheserate in folgender Weise zum Ausdruck kommen.

$$(2) \text{ DNA-Syntheserate der Parenchymzellen} = \frac{\text{Spez. Akt. d. DNA}_p}{I_p} \times 100\%$$

Aus Formel (1) und (2) ergab sich zur Berechnung der DNA-Syntheserate der radioaktiv-markierten Parenchymzellkerne:

$$\text{DNA-Syntheserate der Parenchymzellen} = \frac{4 \times \text{Spez. Akt. d. DNA}_L}{4 \times I_p + I_b}$$

Gegen diese Art der Berechnung ist einzuwenden, daß auch in

Gallengangszellen eine DNA-Synthese beobachtet wurde und daß für dasselbe Leberpräparat bei der autoradiographischen Auswertung unterschiedliche Silberkorndichte über den einzelnen Leberzellkernen notiert worden war. Auch waren aus der Literatur weder Angaben über das Zahlenverhältnis zwischen Bindegewebs- und Parenchymzellkernen noch Untersuchungen über die Ploidie in den Bindegewebszellkernen bekannt. Dagegen lagen Untersuchungsergebnisse bezüglich der Ploidie in Parenchymzellkernen der ruhenden Leber erwachsener Ratten vor, die auf die regenerierende Rattenleber bis zum Beginn der ersten S-Phase p.Hep. im wesentlichen übertragbar sein dürften. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, daß etwa 90% der Leberparenchymzellkerne tetraploid sind (15). Der Rest setzt sich vorwiegend aus diploiden und oktoploiden zusammen, wobei die ersteren überwiegen (28). In den Berechnungen wurden vereinfachend alle Parenchymzellkerne als tetraploid angenommen. Ein zusätzlicher Fehler ergab sich durch die Zunahme des DNA-Gehalts der Parenchymzellkerne während der ablaufenden S-Phase.

Aus diesen genannten Gründen ist das Auszählen von Silberkörnern über den einzelnen Zellkernen die zwar mühseligere, aber bedeutend genauere Methode zur Bestimmung der DNA-Syntheserate der einzelnen radioaktiv-markierten Parenchymzellkerne. Wenn es jedoch erforderlich ist, die DNA-Syntheserate der radioaktiv-markierten Parenchymzellkerne insgesamt zu erfassen, so zeigt die angeführte Rechnung ein

genaueres Ergebnis als die unkorrigierte Spezifische  
Aktivität der DNA der Leber.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener HU-Konzentrationen auf den $^3\text{H}$ -TdR-Einbau der regenerierenden Rattenleber

Toxische und DNA-Synthese-inhibierende HU-Konzentrationen sind für verschiedene Zellstämme *in vitro* (30, 48) und Zelltypen *in vivo* (10, 31) unterschiedlich. Es mußte daher zunächst die Dosisabhängigkeit der HU-Hemmwirkung auf die DNA-Synthese bei der regenerierenden Rattenleber bestimmt werden.

Sechs Ratten erhielten eine HU-Infusion von der 14. bis zur 21,5. Stunde nach 2/3-Hepatektomie mit Dosen zwischen  $5 \times 10^{-3}$  und  $7,7 \times 10^{-5}$  Mol pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde. Unmittelbar nach Beendigung der Infusion wurde  $^3\text{H}$ -TdR i.p. injiziert. Um einen Anhaltspunkt für die Background-Aktivität zu erhalten, wurde ein Tier nur laparotomiert und 26,5 Stunden später mit  $^3\text{H}$ -TdR pulsmarkiert. Die für das säureunlösliche Präzipitat und die Spezifische Aktivität der DNA eines jeden Tieres ermittelten Radioaktivitätswerte sind in Tab. 1 und Abb. 2 dargestellt.

Die Kurven zeigen weitgehend parallelen Verlauf. Eine beträchtliche Verstärkung der  $^3\text{H}$ -TdR-Einbauhemmung hatten Verdoppelung bzw. Vervierfachung der niedrigsten verwendeten Infusionsdosis zur Folge. Für die höheren Dosen blieben vergleichbare Wirkungssteigerungen aus, teilweise wurde sogar eine gesteigerte Radioaktivität ermittelt, so daß in den weiteren Versuchen mit einer HU-Dosis von

$1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h weitergearbeitet wurde.

Die trotz Dosissteigerung höheren Meßwerte könnten mit einer Streuung durch biologisch unterschiedliche Reaktion der einzelnen Tiere auf die Droge oder mit unvermeidbaren Ungenauigkeiten der Untersuchungsmethoden, die sich im Bereich sehr niedriger Werte stärker auswirkten, erklärt werden.

Zur Bestimmung des Background war nur ein Tier verfügbar. Verglichen mit diesem war die Radioaktivität im säureunlöslichen Präzipitat nach Behandlung mit der Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h niedriger. Weil auch der für die Spezifische Aktivität der DNA ermittelte Wert nur gering höher lag, wurde eine annähernd vollständige DNA-Synthesehemmung zu dieser Zeit durch die verwendete Dosis angenommen.

### 3.2. Kinetik der DNA-Synthese in der Leber als Funktion des Zeitintervalls nach HU-Infusionen unterschiedlicher Dauer

Im vorigen Versuch wurde im Bereich relativ niedriger HU-Dosen mit ihrer Steigerung zunehmende Hemmwirkung der Droge auf die DNA-Synthese festgestellt. Die HU-Behandlungszeit betrug 7,5 Stunden. Unter prolongierter HU-Einwirkung bis zu 24 Stunden ist für Zellen in vitro eine Verkürzung der Überlebenszeit beschrieben worden (8, 30). Über die Kinetik der DNA-Synthese in der regenerierenden Leber als Funktion der Dauer eines HU-Blocks liegen dagegen keine Angaben vor. Es wurde deshalb untersucht, ob die Leber mit der DNA-Synthese auch nach mehrstündigen HU-Behandlungen wieder beginnt und in welcher Beziehung

Beginn und Verlauf der postinfusionellen DNA-Synthese zur Infusionsdauer stehen.

Die zur Infusion verwendete HU-Dosis betrug  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Vier Gruppen mit 14, 9, 8 und 9 Tieren und der Infusionsdauer von der 14. bis 24,5., 32., 40. und 44. Std. p.Hep. wurden untersucht. Die Radioaktivität des Perchlorsäurepräzipitats und die Spezifische Aktivität der DNA wurden bestimmt.

### 3.2. 1. Infusionsdauer: 14. - 24,5. Stunde nach 2/3-Hepatektomie (10,5 Stunden)

Die Tiere wurden unmittelbar nach Beendigung der HU-Infusion und weiter in stündlichen Intervallen bis zur 14. Stunde nach Absetzen des HU - nicht jedoch zur 6. Std. p.Inf. - einmalig mit  $^3\text{H-TdR}$  injiziert. Tab. 2 zeigt die in Abb. 3 graphisch dargestellten Werte.

Die Kurve der Spezifischen Aktivität der DNA verläuft weitgehend parallel zu der für die Radioaktivität des Perchlorsäurepräzipitats erhaltenen. Mit zeitlichem Abstand vom Infusionsende steigen die Werte als Zeichen zunehmender DNA-Syntheseaktivität, und erreichen zur 6. Std. p.Inf. ihr Maximum. Die unmittelbar anschließenden niedrigen Werte werden von den folgenden teilweise überschritten. Verglichen mit dem Anfang schien also gegen Ende der Untersuchungszeit DNA noch synthetisiert worden zu sein, wenngleich signifikant erhöhte DNA-Synthese nur während etwa 6 Stunden nachgewiesen wurde. Für die normal regenerierende Rattenleber wurde  $t_s = 7,6$  Stunden ermittelt (37). Zu ähnlichen S-Phasenverkürzungen unter HU-Einwirkung kam es

in Zellkulturen (30, 49) und in einem Karzinom in vivo (40). Ebenso steht die terminal erhöhte DNA-Synthese im Einklang mit früheren Untersuchungen, bei denen zur 40. Stunde nach 2/3-Hepatektomie läppchenzentrale Hepatocyten in der S-Phase nachgewiesen wurden (35).

Die niedrigen Werte zur 5. Std.p.Inf. könnten wie oben beschrieben streuungsbedingt oder durch eine unbemerkt gebliebene Störung der Infusion hervorgerufen worden sein. Für die extrem niedrigen Werte zur 2. Std.p.Inf. war vielleicht eine unbemerkte venöse Stauung der Restleber bei der Teilhepatektomie die Ursache, auf die auch die starke Verfettung der Leber zurückgeführt werden könnte. Daneben muß an eine möglicherweise mißglückte  $^3\text{H}$ -TdR-Injektion gedacht werden, bei der die Lösung statt i.p. versehentlich in die während der Operation geschaffene subcutane Bauchwandtasche appliziert worden sein könnte. Sicherlich wären die Resorptionsbedingungen für  $^3\text{H}$ -TdR hier schlechter als im Peritonealraum.

### 3.2. 2. Infusionsdauer: 14. - 32. Stunde nach 2/3-Hepatektomie (18 Stunden)

Vom Infusionsende an bekamen die Tiere stündlich das tritiummarkierte Thymidin bis zur 9., nicht jedoch zur 8. Std.p.Inf. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 und Abb. 4 zusammengefaßt.

Auch hier steigt der  $^3\text{H}$ -TdR-Einbau mit dem zeitlichen Abstand vom Infusionsende. Nach den zur 5. Std.p.Inf. registrierten Höchstwerten fallen die Kurven zum Schluß des

untersuchten Zeitintervalls hin ab, ohne daß wegen der wenigen Tiere hier eine Aussage über das Ausmaß der DNA-Synthese verglichen mit der anfangs stattfindenden gemacht werden kann.

Die nicht in das Bild passenden niedrigen Werte zur 4. Std.p.Inf. stammen von einem stark verfetteten Leberpräparat. Als Ursache kommen ungewöhnliche Empfindlichkeit des Tieres gegenüber der toxischen Drogenwirkung, unbemerkte partielle Ligatur des venösen Abflusses der Restleber bei der 2/3-Hepatektomie oder beides in Frage.

### 3.2. 3. Infusionsdauer: 14. - 40. Stunde nach 2/3-Hepatektomie (26 Stunden)

Außer bei Infusionsende und zur 5. Std.p.Inf. erhielten die Tiere auch hier das radioaktiv-markierte Nucleosid bis zur 9. Stunde in stündlichen Abständen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 und Abb. 5 niedergelegt.

Die ersten Werte liegen vergleichsweise hoch zu den entsprechenden der vorausgehenden Versuche; außerdem streuen sie stark. Für die 6. Std.p.Inf. wurden die höchsten Werte in dieser ganzen Versuchsreihe bestimmt. Steiler Abfall der Kurven mit abschließend niedriger Radioaktivität folgen.

Ungewöhnlich niedrige Werte wurden schon zu erklären versucht. Ob jedoch die hohen Werte zur 3. Std.p.Inf. Ausdruck einer hohen DNA-Synthese trotz HU oder Folge eines unbemerkt gestörten Infusionsverlaufs sind, kann nicht gesichert werden. Die abschließend geringe Radioaktivität könnte ein

Hinweis dafür sein, daß die meisten zur DNA-Synthese fähigen Zellen die S-Phase durchlaufen hatten. Jedenfalls wurde zur 48. Std.p.Hep. bei der normal regenerierenden Rattenleber in allen Lobuluszonen ein geringer Markierungsindex nachgewiesen (35).

3.2. 4. Infusionsdauer: 14. - 44. Stunde nach 2/3-Hepatektomie (30 Stunden)

Bis zur 1,5. Std.p.Inf. erhielten die Tiere das radioaktiv-markierte Thymidin in halbstündigem Abstand, zwischen der 4. und 7. in stündlichem. Außerdem wurde zur 2,25. Std.p.Inf.  $^3\text{H}$ -TdR gespritzt. Tab. 5 und Abb. 6 zeigen die Ergebnisse.

Verglichen mit dem vorausgehenden Versuch sind hier die Anfangswerte sehr niedrig und die Maximalwerte für Perchlorsäurepräzipitat und Spezifische Aktivität der DNA erreichen nicht dieselbe Höhe. Die Übergänge der Scheitelpunkte in die absteigenden Teile der Kurven sind wegen fehlender Tiere nicht erfaßt. Die niedrigen Werte zur 5. Std.p.Inf. sind auf einen Fehler der Infusion begründet, die aus Versehen eine Stunde zu früh (43. Std.p.Hep.) beendet wurde. Die Ergebnisse stellen also eher die Situation 50 als 49 Stunden nach 2/3-Hepatektomie dar. Sehr niedrige Werte beschließen die Kurven.

Die niedrigen Anfangswerte könnten die Folge von Schäden im DNA-Synthese-Stoffwechsel sein, deren Ursache bei derart langen Behandlungsintervallen - die Infusionszeit entsprach fast einer Zellzykluszeit - vielleicht eine abnehmende Toleranz des Lebergewebes gegenüber der toxischen Wirkung

der Droge ist. Auch HeLa-Zellen, die recht unempfindlich auf HU bezüglich des Überlebens reagieren, wurden durch ausgedehnte HU-Expositionszeiten stark geschädigt (30).

### 3.3. Beziehung zwischen HU - Infusionsdauer und Synchronisationsgrad der Leberzellen

Bisher konnte gezeigt werden, daß die regenerierende Rattenleber auch nach langer HU-bedingter DNA-Synthesehemmung die Fähigkeit, DNA zu synthetisieren, nicht verliert. Ferner schwächte sich außer im Fall der 30stündigen HU-Infusion mit der Infusionsdauer einer konstant bleibenden HU-Dosis der HU-Block ab, wie aus den steigenden, unmittelbar nach Infusionsende ermittelten Werten hervorging. Gleichzeitig ließen aber die höheren Maximalwerte im Anschluß an längere Infusionszeiten auch höhere DNA-Syntheseaktivität in der Leber vermuten. Im folgenden wurde mit größerer statistischer Genauigkeit untersucht, inwieweit sich mit Verlängerung der HU-Behandlung die  $^3\text{H}$ -TdR-Utilisation und die Zahl synchron DNA-synthetisierender Hepatocyten steigern ließ.

Dazu wurden die Zeitpunkte höchster DNA-Syntheseaktivität nach unterschiedlichen Infusionsintervallen an Hand der vorausgehenden Versuche ausgewählt. 4, 5, 5 und 5 Tiere erhielten eine HU-Infusion von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h von der 14. bis zur 21,5., 28,5., 36. und 44. Std.p.Hep.; 4,5 4,5, 3 und 3 Stunden nach Infusionsende wurde radioaktives Thymidin injiziert. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Synchronisation durch HU bekamen je zwei teilhepatektomierte

Tiere  $^3\text{H}$ -TdR ( $0,2 \mu\text{Ci/g/h}$ ) ohne HU von der 14. bis zur 26,58., 33,58., 39,58. und 47,58. Std.p.Hep. dauerinfundiert. Ferner erhielten je drei 2/3-hepatektomierte Tiere physiologische Kochsalzlösung ohne HU während des jeweiligen HU-Infusionszeitraums zur Überprüfung einer eventuellen, infusionsbedingten DNA-Synthesebeeinträchtigung. Neben autoradiographischer Auswertung erfolgte Radioaktivitätsbestimmung im säureunlöslichen Präzipitat. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 und 7 sowie Abb. 7 und 8 zusammengefaßt.

Im säureunlöslichen Präzipitat erfolgt ein ausgeprägter Anstieg der Radioaktivität von der 7,5 zur 14,5stündigen HU-Infusion, der wahrscheinlich erhöhter DNA-Synthese in der Leber durch gesteigerte Synchronisation der Hepatocyten in der S-Phase zugeschrieben werden kann. Der Abfall der Kurve nach 30 Stunden Infusion könnte wie im vorigen Versuch mit einer HU-bedingten Schädigung erklärt werden. Aber schon nach 22stündiger HU-Infusion wurde eine Abnahme der Radioaktivität festgestellt. Als Ursache kommt ein ungünstig gewählter Untersuchungszeitpunkt nach der Infusion in Frage. Zwar zeigten die vorausgehenden Versuche erhöhte DNA-Synthese über mehrere Stunden, maximale Aktivität findet sich aber vielleicht nur während eines sehr kurzen Zeitraums, der hier möglicherweise verfehlt wurde.

Die  $^3\text{H}$ -TdR infundierten Kontrolltiere lieferten mit längerer Infusionszeit höhere Werte. Dieses ist neben der zunehmenden Zahl von Hepatocyten, die mit der Zeit nach 2/3-Hepatektomie die S-Phase während der  $^3\text{H}$ -TdR-Infusion durchlaufen haben (35), auch auf die gleichsinnig mit der Infusionsdauer

steigende  $^3\text{H}$ -TdR-Dosis zurückzuführen.

Bei den NaCl-Kontrolltieren fand maximale DNA-Synthese sicher vor der 27. Stunde statt (35, 37). Sie wurde in diesem Versuch nicht erfaßt. Der Wiederanstieg bereits nach der 34. Std.p.Hep. ist wahrscheinlich auf den Beginn der zweiten DNA-Synthesewelle zurückzuführen (37).

Die Kurve des Markierungsindex steigt bei den HU-Tieren mit längerer Infusionsdauer zwar schwächer, aber kontinuierlich an und kennzeichnet eine mit der HU-Behandlungszeit größer werdende Fraktion synchron DNA-synthetisierender Hepatocyten. Zur 48. Std.p.Hep. schließlich lag der Markierungsindex um den Faktor acht über dem Maximum der NaCl-Kontrolltiere, wobei nochmals darauf hingewiesen sei, daß die höchste DNA-Syntheseaktivität der Kontrollen vor dem untersuchten Zeitintervall liegt. Der höchste Markierungsindex in der regenerierenden Leber nicht durch Infusionen belasteter Tiere wird um das 2,5 - 3fache übertroffen (34).

Annähernd parallel zu ihr verläuft die Kurve der radioaktiv-markierten Tiere. Sie liegt etwas tiefer, was die Folge strahlentoxisch geringerer Proliferationsneigung in den  $^3\text{H}$ -TdR-Tieren (13) oder drogenbedingter Stimulation des Lebergewebes der HU-Tiere sein kann (41).

#### 3.4. $^3\text{H}$ -TdR-Einbau der regenerierenden Leber und ihrer Zellkompartimente nach 25stündigen HU-Infusionen

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Versuche zeigten, daß die Kinetik der DNA-Synthese in Abhängigkeit von der Blockdauer Unterschiede aufweist und daß sich nach 22-stündiger HU-Infusion ein hoher Prozentsatz von Hepatocyten in der DNA-Synthese befindet. Er war durch eine Verlängerung der Infusion noch zu steigern, doch traten gleichzeitig Anzeichen toxischer Schädigungen auf. Das Ziel, unter möglichst schonenden Bedingungen eine Höchstzahl synchron DNA-replizierender Hepatocyten zu erhalten, schien durch 25stündige Infusion am ehesten erreichbar. Die Proliferationskinetik wurde daher in gleicher Versuchsanordnung zu diesem Zeitpunkt genauer untersucht.

Die Tiere wurden von der 14. bis 39. Std.p.Hep. mit einer HU-Infusion von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h behandelt. 0, 1, 2, 6, 7 und 8 Stunden danach erhielt je ein Tier eine  $^3\text{H}$ -TdR-Injektion und in dem Intervall zwischen 2 Stunden 20 Minuten und 5 Stunden 40 Minuten nach der HU-Infusion jeweils ein Tier in zehnminütigem Abstand. Ferner bekam je ein Tier in der 37. und 38. Std.p.Hep. radioaktives Thymidin i.p. injiziert ohne Unterbrechung der Infusion, die bis zum 60 Minuten später erfolgenden Versuchsende weiterlief. Die Radioaktivität im säurepräzipitierten Leberhomogenat und die Spezifische Aktivität des DNA-Extrakts wurden gemessen. Bei der autoradiographischen Auswertung wurden Markierungs-

indices für stark und schwach markierte Leberzellkerne sowie für Bindegewebs- und Gallengangszellkerne bestimmt. Zur graphischen Darstellung in Abb. 9-15 wurde der Mittelwert von drei benachbarten, in zehnminütiger Folge markierten Tieren und seine mittlere Abweichung berechnet. Für die Bestimmung der Werte 4,5 und 6 Std.p.Inf. waren je zwei Tiere verfügbar. In Tab. 8-10 sind die Ergebnisse tabellarisch zusammengefaßt.

Die Kurvenverläufe für die Spezifische Aktivität der DNA (Abb. 9 und Tab. 8), die Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats (Abb. 10 und Tab. 8) und die DNA-Synthese-Rate der Hepatocyten (Abb. 11 und Tab. 9) ähneln sich. Über den Beginn der DNA-Synthese in der Leber kann wegen der wenigen Tiere während der Aufstiegsphasen der Kurven auch hier nichts Genaues gesagt werden; die niedrigen Werte sprechen jedoch für geringe DNA-Syntheseaktivität. Maximale Werte finden sich für etwa eine Stunde zwischen der 3,5. und 4,5. Std.p.Inf. Ihnen folgt ein stufenförmiger Abfall, dessen Formentstehung unklar ist. Nach Durchlaufen eines Tiefpunktes zeigen alle Kurven wieder gesteigerte DNA-Synthese an. Dabei liegen die für die DNA-Syntheserate der Hepatocyten ermittelten Werte relativ höher, weil versucht wurde, bei deren Berechnung die den Bindegewebszellen zukommende Radioaktivität zu berücksichtigen.

Während in den eben beschriebenen Kurven die Werte noch niedrig sind, ist der Markierungsindex der Hepatocyten (Abb. 12 und Tab. 9) bereits hoch, wobei die Werte am Anfang und Ende der Kurve, die jeweils von nur einem Tier stammen,

schwanken. Nach dem Maximum zur 3,5. Std.p.Inf. sinkt der Gesamtmarkierungsindex zwei Stunden lang kontinuierlich schwach ab. Ein starker Abfall auf niedrige Werte zur 6,5. Std.p.Inf. folgte. Die Untersuchung der abschließenden Einzeltiere ergab wieder eine Zunahme DNA-synthetisierender Hepatocyten.

Auffallend ist die nur anfangs auftretende Vielzahl schwach markierter Zellkerne. Ihre Zahl verringerte sich nach der 2. Std.p.Inf. stark und änderte sich dann kaum während der nächsten 5 Stunden. Der letzte Wert des untersuchten Zeitraums liegt jedoch hoch. Mögliche Ursache der anfangs erhöhten Zahl könnte unter HU-Behandlung ungehemmte "repair-DNA"- oder "small-DNA"-Synthese sein, die in Zellkulturen beobachtet wurde (5, 8).

Während der Markierungsindex der schwach markierten Hepatocyten abfällt, steigt der stark markierter und erreicht für etwa 2,5 Stunden Höchstwerte. Nach einem steilen Abfall zur 6,5. Std.p.Inf. auf sehr niedrige Werte, wurden abschließend stark markierte Hepatocyten wieder häufiger beobachtet.

Der stufige Abfall der Kurven für die Spezifische Aktivität der DNA und Radioaktivität des Perchlorsäurepräzipitats sowie die, wenn auch schwach ausgeprägte, Zweigipfligkeit der Kurve stark markierter Hepatocyten könnten Hinweise auf postinfusionell wechselnde DNA-Syntheseaktivität in der Leber sein. Dafür spricht auch der nach Erreichen tiefster Werte abschließende Wiederanstieg. Es handelte sich hierbei zwar nur um Einzeltiere, deren Werte insgesamt aber eine steigende Tendenz zeigen, so daß hier erhöhte DNA-Synthese in der Leber

angenommen werden muß. In welchem Umfang während der Untersuchung die DNA-synthetisierende Hepatocytenpopulation wechselte oder gleich blieb, geht aus den Ergebnissen nicht hervor. Wahrscheinlich beginnt ein kleiner Teil der Hepatocyten während des abschließenden Wiederanstiegs erstmals DNA zu synthetisieren. Daneben zeigt aber der hohe Markierungsindex, daß zur Zeit des Maximums bereits einmal erfaßte Hepatocyten teilweise auch an der Ausbildung des Wiederanstiegs zum Schluß der Untersuchungszeit beteiligt gewesen sein müssen.

Die Markierungsindices der Gallengangs- (Abb. 13 und Tab. 10) und Bindegewebszellen (Abb. 14 und Tab. 10) streuen stark, vor allem dann, wenn nur zwei Tiere verfügbar waren. Eine größere statistische Ungenauigkeit aufgrund der kleineren ausgezählten Zellzahl kommt vor allem für die Gallengangszellen hinzu.

Der Markierungsindex der Gallengangszellen steigt langsam von der 3. Std.p.Inf. an und erreicht zur 6. Std.p.Inf. seinen Maximalwert. Danach finden sich bis zum Ende des Untersuchungszeitraums erhöhte Werte. Der Nullwert zur 7. Std.p.Inf. ist am ehesten auf das nekrotische Leberpräparat dieses Tieres zurückzuführen.

Die Kurve des Markierungsindex für Bindegewebszellen zeichnet sich durch einen zweiphasigen aufsteigenden Ast aus. Dabei beginnt eine erste beträchtliche Erhöhung der Werte, nachdem die Parenchymzellen den maximalen Markierungsindex erreicht haben. Etwa zwei Stunden später erfolgt eine zweite im Anschluß an den Höchstwert der Gallengangszellen. Die

Werte bleiben auch nach diesem Anstieg hoch und zeigen dabei eine abfallende Tendenz.

Der Mitoseindex erreichte nach Abklingen der DNA-Synthese unter stark schwankenden Werten zur 8. Stunde nach Infusionsende ein Maximum von 5,5%. Bei einer Dauer der prämitotischen Phase von 3 Stunden und der DNA-Synthesephase von 7,6 Stunden sind höhere Werte auch im Fall einer beträchtlichen Verkürzung der Phasen erst nach dem untersuchten Zeitintervall zu erwarten.

### 3.5. Untersuchungen zur Toxizität von HU-Dauerinfusionen

Für 25stündige HU-Infusionen bis zur 39. Std.p.Hep. wurden keine sofort sichtbaren Zeichen toxischer Wirkung festgestellt. Frühere Arbeiten ließen jedoch eine eingeschränkte Überlebenszeit HU-behandelter Tiere durch irreversible Schädigung von Wechselgeweben vermuten (10, 31).

Da sich HU-Infusionen mit  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h zur Synchronisation der DNA-Synthese in der Leber bewährten, wurde eine Überlebenszeitbestimmung für diese Dosierung durchgeführt (Tab. 11). Eine 9- und 16stündige Infusion von der 14. Std.p.Hep. an überlebten alle Versuchstiere. Nach einer 22stündigen Infusion starben eins von vier 2/3-hepatektomierten und eins von zwei laparotomierten Tieren am zweiten und vierten Tag nach Behandlungsende. Die Infusionsdauer von 30 Stunden wurde auch von laparotomierten Tieren über

den zweiten Tag nach Infusionsende hinaus nicht überlebt.

| Tier-<br>zahl | Infusions-<br>zeit (Std.<br>p.Hep.) | Operation | Überlebens-<br>rate | Überlebens-<br>dauer der<br>gestorbenen<br>Tiere |
|---------------|-------------------------------------|-----------|---------------------|--------------------------------------------------|
| 3             | 14.-23.                             | 2/3-Hep.  | 3/3                 |                                                  |
| 2             | 14.-30.                             | 2/3-Hep.  | 2/2                 |                                                  |
| 4             | 14.-36.                             | 2/3-Hep.  | 3/4                 | 2 Tage                                           |
| 2             | 14.-36.                             | Laparat.  | 1/2                 | 4 Tage                                           |
| 2             | 14.-44.                             | Laparat.  | 0/2                 | 2 Tage                                           |

Tab. 11: Mortalität nach HU-Infusionen verschiedener Dauer mit einer Dosis von  $1,25 \times 10^{-5}$  Mol/kg/h. Std.p.Hep.: Stunden nach 2/3-Hepatektomie. 2/3-Hep.: 2/3-Hepatektomie. Laprat.: Laparatomie.

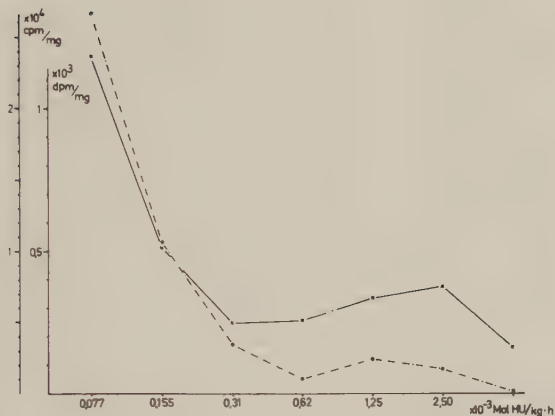


Abb. 2: Radioaktivität in DNA (o---o) und säureunlöslicher Fraktion (x—x) der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach i.p. Injektion von tritiummarkiertem Thymidin in Abhängigkeit von der infundierten HU-Konzentration. Die Infusion begann 14 Stunden nach 2/3-Hepatektomie und dauerte 7,5 Stunden. Bei Infusionsende wurde das radioaktive Thymidin injiziert. Ordinaten, links: Radioaktivität der DNA in Impulsen pro Minute und Milligramm DNA, rechts: Radioaktivität der säureunlöslichen Fraktion der Leber in Zerfällen pro Minute und Milligramm Präzipitat nach Trocknung. Abszisse: HU-Dosis in Mol pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde.

| Tier | HU-Dos.<br>( $\times 10^{-3}$<br>Mol/kg/h) | Spez.Akt.<br>d. DNA <sub>L</sub><br>(cpm/mg) | Radioakt.d.<br>HClO <sub>4</sub> -Präz.<br>(dpm/mg) |
|------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1    | 5,000                                      | 80                                           | 170                                                 |
| 2    | 2,500                                      | 1.740                                        | 380                                                 |
| 3    | 1,250                                      | 2.410                                        | 340                                                 |
| 4    | 0,620                                      | 1.030                                        | 260                                                 |
| 5    | 0,310                                      | 3.440                                        | 250                                                 |
| 6    | 0,155                                      | 10.700                                       | 520                                                 |
| 7    | 0,077                                      | 26.680                                       | 1.190                                               |
| 8    | -                                          | 1.620                                        | 690                                                 |

Tab. 1: Die zu Abb. 2 gehörenden Werte. Das Tier 8 ist nicht graphisch dargestellt. Es wurde laparotomiert, 26,5 Stunden später mit radioaktivem Thymidin pulsmarkiert und dann wie die übrigen Tiere behandelt. HU-Dos.: HU-Dosis, Spez.Akt.d.DNA<sub>L</sub>: Spezifische Aktivität der DNAL, Radioakt.d.HClO<sub>4</sub>-Präz.: Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats.

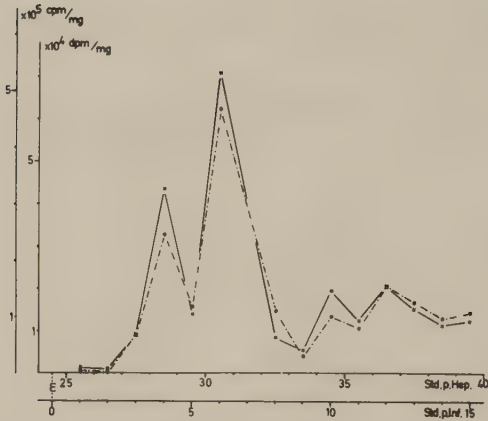
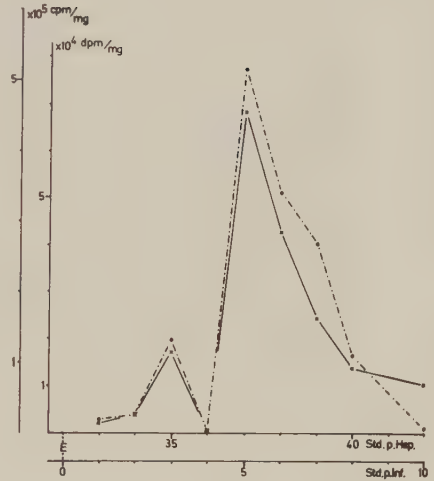


Abb. 3: Spezifische Aktivität der DNA (o---o) und Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats (x---x) der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion des tritiummarkierten Thymidins in Abhängigkeit von der Zeit nach 10,5stündiger HU-Infusion mit der Dosis von  $1,25 \times 10^{-5}$  Mol/kg/h. Ordinaten, links: Radioaktivität der DNA in Impulsen pro Minute und Milligramm DNA, rechts: Radioaktivität der säureunlöslichen Fraktion der Leber in Zerfällen pro Minute und Milligramm Präzipitat nach Trocknung. Abszissen, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende. E: Infusionsende zur 24,5.Stunde nach 2/3-Hepatektomie.

| Tier | Stunden<br>nach Infu-<br>sionsende | Stunden nach<br>2/3-Hepatek-<br>tomie | Spez.Akt.<br>d. DNA <sub>L</sub><br>( $\times 10^3$<br>cpm/mg) | Radioakt.<br>d. HClO <sub>4</sub> -<br>Präz.<br>( $\times 10^2$<br>dpm/mg) | Bemerkung |
|------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1    | 1                                  | 25,5                                  | 0,5                                                            | 7                                                                          |           |
| 2    | 2                                  | 26,5                                  | 0                                                              | 3                                                                          |           |
| 3    | 3                                  | 27,5                                  | 68                                                             | 87                                                                         |           |
| 4    | 4                                  | 28,5                                  | 246                                                            | 434                                                                        |           |
| 5    | 5                                  | 29,5                                  | 117                                                            | 140                                                                        |           |
| 6    | 6                                  | 30,5                                  | 468                                                            | 707                                                                        |           |
| 7    | 8                                  | 32,5                                  | 109                                                            | 84                                                                         |           |
| 8    | 9                                  | 33,5                                  | 31                                                             | 53                                                                         |           |
| 9    | 10                                 | 34,5                                  | 99                                                             | 195                                                                        | g         |
| 10   | 11                                 | 35,5                                  | 79                                                             | 125                                                                        |           |
| 11   | 12                                 | 36,5                                  | 156                                                            | 204                                                                        | g         |
| 12   | 13                                 | 37,5                                  | 125                                                            | 154                                                                        |           |
| 13   | 14                                 | 38,5                                  | 98                                                             | 114                                                                        |           |
| 14   | 15                                 | 39,5                                  | 108                                                            | 125                                                                        |           |

Tab. 2: Die zu Abb. 3 gehörenden Werte. Ein g in der Spalte Bemerkung bedeutet bei der Sektion aufgefallene, fettbedingte Gelbfärbung der Restleber.

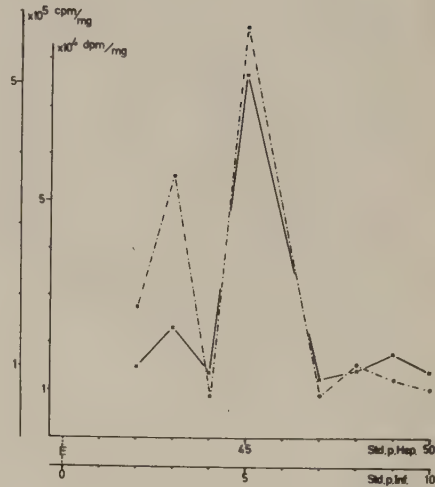
Abb. 4: Spezifische Aktivität der DNA (o---o) und Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats (x—x) der regenerierenden Ratte-leber 60 Minuten nach Injek-tion des tritiummarkierten Thy-midins in Abhängigkeit von der Zeit nach 18stündiger HU-Infu-sion mit einer HU-Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinate, links: Radioaktivität der DNA in Impul-sen pro Minute und Milligramm, rechts: Radioaktivität der säure-unlöslichen Fraktion in Zerfällen pro Minute und Milligramm Präzi-pitat nach Trocknung. Abszisse, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende, E: Infusionsende zur 32. Stunde nach 2/3-Hepatektomie.



| Tier | I<br>Stunden<br>nach Infu-<br>sionsende | II<br>Stunden<br>nach 2/3-<br>Hepatek-<br>tomie | Spez.Akt.<br>d. DNA <sub>L</sub><br>( $\times 10^3$<br>cpm/mg) | Radioakt.<br>d. HClO <sub>4</sub> -<br>Präz. 2<br>( $\times 10^2$<br>dpm/mg) | Bemerkung |
|------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1    | 1                                       | 33                                              | 19                                                             | 19                                                                           |           |
| 2    | 2                                       | 34                                              | 26                                                             | 40                                                                           |           |
| 3    | 3                                       | 35                                              | 132                                                            | 174                                                                          |           |
| 4    | 4                                       | 36                                              | 4                                                              | 7                                                                            | g         |
| 5    | 5                                       | 37                                              | 518                                                            | 686                                                                          |           |
| 6    | 6                                       | 38                                              | 342                                                            | 433                                                                          |           |
| 7    | 7                                       | 39                                              | 274                                                            | 245                                                                          |           |
| 8    | 8                                       | 40                                              | 111                                                            | 141                                                                          |           |
| 9    | 10                                      | 42                                              | 6                                                              | 105                                                                          |           |

Tab. 3: Die zu Abb. 4 gehörenden Werte. Ein g in der Spalte Bemerkung bedeutet bei der Sektion aufgefallene, fettbedingte Gelbfärbung der Restleber. Spez.Akt.d.DNA<sub>L</sub>: Spezifische Akti-vität der DNA der Leber, Radioakt.d.HClO<sub>4</sub>-Präz.: Radioaktivi-tät der säureunlöslichen Fraktion der Leber.

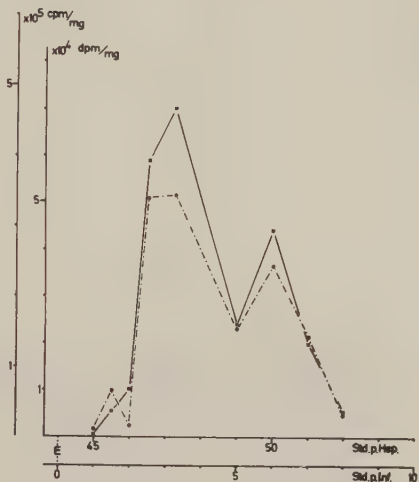
Abb. 5: Spezifische Aktivität der DNA (o---o) und Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats (x—x) der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion des tritiummarkierten Thymidins in Abhängigkeit von der Zeit nach 26-stündiger HU-Infusion mit einer HU-Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinaten, links: Radioaktivität der DNA in Impulsen pro Minute und Milligramm, rechts: Radioaktivität der säureunlöslichen Fraktion in Zerfällen pro Minute und Milligramm Präzipitat nach Trocknung. Abszissen, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende zur 40. Stunde nach 2/3-Hepatektomie.



| Tier | ±<br>Stunden<br>nach Infu-<br>sionsende | ±<br>Stunden<br>nach 2/3-<br>Hepatek-<br>tomie | Spez.Akt.<br>d. DNA <sub>L</sub><br>(x 10 <sup>3</sup><br>cpm/mg) | Radioakt.<br>d. HClO <sub>4</sub> -<br>Präz. <sup>2</sup><br>(x 10 <sup>2</sup><br>dpm/mg) |
|------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    | 2                                       | 42                                             | 186                                                               | 158                                                                                        |
| 2    | 3                                       | 43                                             | 370                                                               | 236                                                                                        |
| 3    | 4                                       | 44                                             | 60                                                                | 144                                                                                        |
| 4    | 5                                       | 45                                             | 584                                                               | 772                                                                                        |
| 5    | 7                                       | 47                                             | 61                                                                | 130                                                                                        |
| 6    | 8                                       | 48                                             | 104                                                               | 148                                                                                        |
| 7    | 9                                       | 49                                             | 84                                                                | 179                                                                                        |
| 8    | 10                                      | 50                                             | 70                                                                | 144                                                                                        |

Tab. 4: Die zu Abb. 5 gehörenden Werte. Spez.Akt.d.DNA: Spezifische Aktivität der DNA, Radioakt.d.HClO<sub>4</sub>-Präz.: Radioaktivität des Perchlorsäurepräzipitats.

Abb. 6: Spezifische Aktivität der DNA (o---o) und Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats (x—x) der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion des tritiummarkierten Thymidins in Abhängigkeit von der Zeit nach 30-stündiger HU-Infusion mit einer HU-Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinaten, links: Radioaktivität der DNA in Impulsen pro Minute und Milligramm Präzipitat nach Trocknung. Abszissen, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende zur 44. Stunde nach 2/3-Hepatektomie.



| Tier | I<br>Stunden<br>nach Infu-<br>sionsende | II<br>Stunden<br>nach 2/3-<br>Hepatek-<br>tomie | Spez. Akt.<br>d. DNA <sub>L</sub><br>( $\times 10^3$<br>cpm/mg) | Radioakt.<br>d. HClO <sub>4</sub> -<br>Präz. 2<br>( $\times 10^2$<br>dpm/mg) | Bemerkung |
|------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1    | 1                                       | 45                                              | 12                                                              | 4                                                                            |           |
| 2    | 1,5                                     | 45,5                                            | 66                                                              | 54                                                                           |           |
| 3    | 2                                       | 46                                              | 17                                                              | 104                                                                          |           |
| 4    | 2,5                                     | 46,5                                            | 341                                                             | 590                                                                          |           |
| 5    | 3,25                                    | 47,25                                           | 345                                                             | 704                                                                          |           |
| 6    | 5+1                                     | 49+1                                            | 155                                                             | 272                                                                          | 1 Std.    |
| 7    | 6                                       | 50                                              | 245                                                             | 475                                                                          |           |
| 8    | 7                                       | 51                                              | 145                                                             | 199                                                                          |           |
| 9    | 8                                       | 52                                              | 33                                                              | 58                                                                           |           |

Tab. 5: Die zur Abb. 6 gehörenden Werte. Tier 6 war eine Stunde zu früh von der Infusion abgehängt worden. Spez. Akt. d. DNA: Spezifische Aktivität der DNA, Radioakt. d. HClO<sub>4</sub>-Präz.: Radioaktivität des Perchlorsäurepräzipitats.

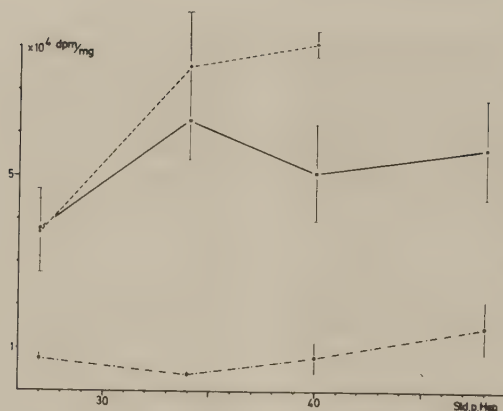


Abb. 7: Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion von tritiummarkiertem Thymidin in Abhängigkeit von der Infusionsdauer mit einer HU-Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Bei den 7,5 und 14,5-stündigen Infusionen wurden die Werte für die 5,5. Stunde nach Infusionsende, bei den 22 und 30stündigen für die 4. Stunde nach Infusionsende ermittelt (x—x). Mit physiologischer Kochsalzlösung (o—o) und <sup>3</sup>H-Thymidin-Lösung (o—o) infundierte 2/3-hepatektomierte Kontrolltiere. Infusionsbeginn: 14. Stunde nach der 2/3-Hepatektomie. Ordinate: Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats in Zerfällen pro Minute und Milligramm Präzipitat nach Trocknung. Abszisse: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie.

| ± Stunden<br>nach 2/3-<br>Hepatektomie | HU-<br>Infusion  | NaCl-<br>Infusion | <sup>3</sup> H-TdR-<br>Infusion |
|----------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|
| 27                                     | 374 (4)<br>± 71  | 76 (2)<br>± 11    | 373 (2)<br>± 94                 |
| 34                                     | 630 (5)<br>± 92  | 39 (3)<br>± 8     | 755 (2)<br>± 127                |
| 40                                     | 509 (5)<br>± 111 | 80 (3)<br>± 35    | 806 (2)<br>± 31                 |
| 48                                     | 563 (5)<br>± 115 | 150 (3)<br>± 62   |                                 |

Tab. 6: Die zu Abb. 7 gehörenden Werte der Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats in Zerfällen pro Minute und Milligramm Präzipitat  $\times 10^2$ . In Klammern steht die Zahl der Tiere, die zur Berechnung des Mittelwerts und seiner mittleren Abweichung jeweils verfügbar war. HU: Hydroxyharnstoffinfusion einer Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. NaCl: mit 0,89% NaCl infundierte Kontrolltiere, <sup>3</sup>H-TdR mit 0,2  $\mu$ Ci/g/h infundierte Kontrolltiere.

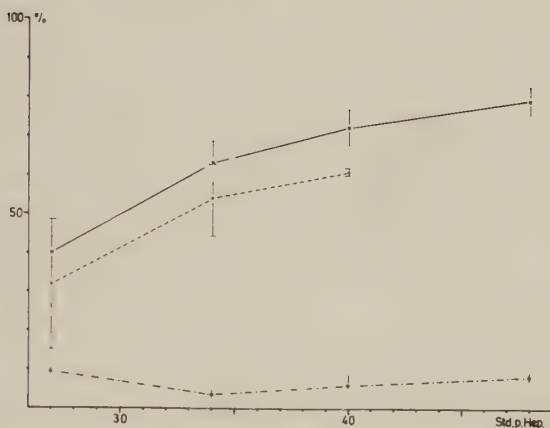


Abb. 8: Markierungsindex der Hepatocytenkerne in der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion von tritiummarkiertem Thymidin in Abhängigkeit von der Infusionsdauer mit einer HU-Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Bei den 7,5- und 14,5stündigen Infusionen wurden die Werte für die 5,5. Stunde nach Infusionsende, bei den 22- und 30stündigen für die 4. Stunde nach Infusionsende ermittelt (x—x). Mit physiologischer Kochsalzlösung (o—o) und <sup>3</sup>H-Thymidin-Lösung (•—•) infundierte 2/3-hepatektomierte Kontrolltiere. Infusionsbeginn: 14. Stunde nach 2/3-Hepatektomie. Ordinate: Prozentsatz markierter Hepatocytenkerne von markierten und unmarkierten Hepatocytenkernen. Abszisse: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie.

| ± Stunden<br>nach 2/3-<br>Hepatektomie | HU-<br>Infusion | NaCl-<br>Infusion | <sup>3</sup> H-TdR-<br>Infusion |
|----------------------------------------|-----------------|-------------------|---------------------------------|
| 27                                     | 40 (4)<br>± 4   | 9 (2)<br>± 2      | 32 (2)<br>± 16                  |
| 34                                     | 63 (5)<br>± 4   | 4 (3)<br>± 1      | 53 (2)<br>± 10                  |
| 40                                     | 73 (5)<br>± 4,5 | 6 (3)<br>± 3      | 61,5 (2)<br>± 1                 |
| 48                                     | 80 (5)<br>± 4   | 8 (3)<br>± 1      |                                 |

Tab. 7: die Zu Abb. 8 gehörenden Werte des Markierungsindex der Hepatocytenkerne. In Klammern steht die Zahl der Tiere, die zur Berechnung des Mittelwerts und seiner mittleren Abweichung jeweils verfügbar war. HU: Hydroxyharnstoffinfusion einer Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h, NaCl: mit physiologischer Kochsalzlösung infundierte Kontrolltiere, <sup>3</sup>H-TdR: mit  $0,2 \mu\text{Ci/g/h}$  radioaktiv-markiertem Thymidin infundierte Kontrolltiere.

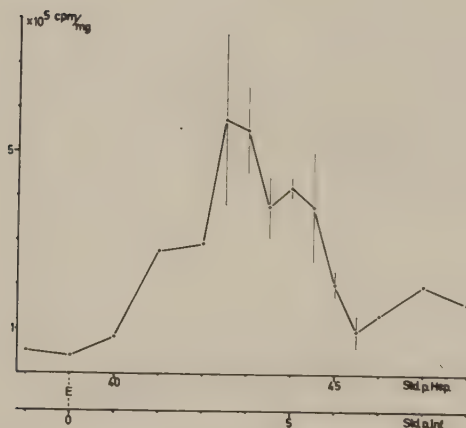


Abb. 9: Spezifische Aktivität der DNA in der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion von tritiummarkiertem Thymidin in Abhängigkeit von der Zeit nach 25stündiger HU-Infusion mit der Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinate: Spezifische Aktivität der DNA in Impulsen pro Minute und Milligramm, Abszisse, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende. E: Infusionsende.

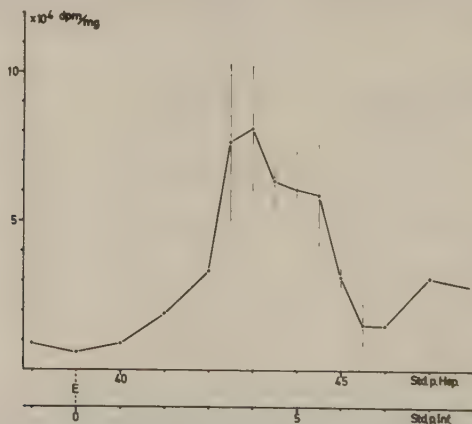


Abb. 10: Radioaktivität des säureunlöslichen Präzipitats der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion von tritiummarkiertem Thymidin in Abhängigkeit von der Zeit nach 25stündiger HU-Infusion mit der Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinate: Radioaktivität des Präzipitats in Zerfällen pro Minute und Milligramm. Abszisse, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende. E: Infusionsende.

| Zahl der<br>Tiere | Stunden<br>p. Inf. | Stunden<br>p. Hep. | Radioakt.<br>d. $\text{HClO}_4$ -<br>Präz. <sup>2</sup><br>( $\times 10^2$<br>dpm/mg) | Spez. Akt.<br>d. $\text{DNA}_L$<br>( $\times 10^3$<br>cpm/mg) |
|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1                 | -1                 | 38                 | 90                                                                                    | 52                                                            |
| 1                 | 0                  | 39                 | 63                                                                                    | 41                                                            |
| 1                 | 1                  | 40                 | 90                                                                                    | 83                                                            |
| 1                 | 2                  | 41                 | 190                                                                                   | 276                                                           |
| 1                 | 3                  | 42                 | 334                                                                                   | 294                                                           |
| 3                 | 3,5                | 42,5               | 765<br>$\pm 271$                                                                      | 574<br>$\pm 184$                                              |
| 3                 | 4                  | 43                 | 818<br>$\pm 180$                                                                      | 549<br>$\pm 100$                                              |
| 2                 | 4,5                | 43,5               | 636<br>$\pm 100$                                                                      | 380<br>$\pm 62$                                               |
| 3                 | 5                  | 44                 | 604<br>$\pm 134$                                                                      | 421<br>$\pm 21$                                               |
| 3                 | 5,5                | 44,5               | 588<br>$\pm 174$                                                                      | 376<br>$\pm 124$                                              |
| 2                 | 6                  | 45                 | 313<br>$\pm 30$                                                                       | 202<br>$\pm 31$                                               |
| 3                 | 6,5                | 45,5               | 158<br>$\pm 67$                                                                       | 96<br>$\pm 35$                                                |
| 1                 | 7                  | 46                 | 150                                                                                   | 134                                                           |
| 1                 | 8                  | 47                 | 313                                                                                   | 201                                                           |
| 1                 | 9                  | 48                 | 278                                                                                   | 159                                                           |

Tab. 8: Die zu Abb. 9 und 10 gehörenden Werte. Stunden p. Inf.: Stunden nach Infusionsende, Stunden p. Hep.: Stunden nach 2/3-Hepatektomie, Radioakt. d.  $\text{HClO}_4$ -Präz.: Radioaktivität des Perchlorsäurepräzipitats, Spez. Akt. d.  $\text{DNA}_L$ : Spezifische Aktivität der  $\text{DNA}_L$ .

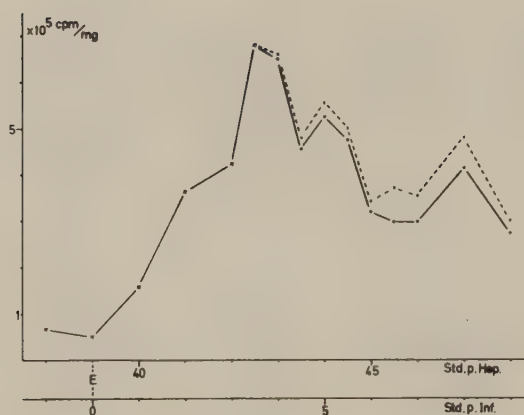


Abb. 11: DNA-Syntheserate der Hepatocytenkerne (o—o), unkorrigierter Quotient aus Spezifischer Aktivität der DNA und Markierungsindex der Hepatocytenkerne (x—x) in Abhängigkeit von der Zeit nach 25stündiger HU-Infusion mit der Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinate: DNA-Syntheserate in Impulsen pro Minute und Milligramm DNA. Abszisse, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende.

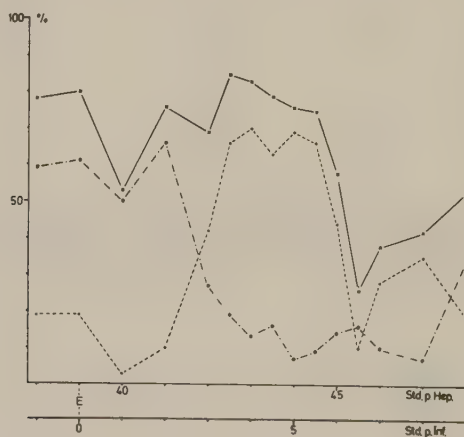


Abb. 12: Markierungsindex aller (x—x), schwach (o-.-o) und stark markierter (●-●) Hepatocytenkerne in der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion von tritiummarkiertem Thymidin in Abhängigkeit von der Zeit nach 25stündiger HU-Infusion mit  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinate: Prozentsatz markierter Hepatocytenkerne. Abszisse, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende. E: Infusionsende.

| Stunden<br>p. Inf. | DNA-Sy.<br>d. Par.<br><br>( $\times 10^3$<br>dpm/mg) | I aller<br>Parenchym-<br>zellkerne<br><br>(%) | I stark<br>markierter<br>Parenchym-<br>zellkerne<br><br>(%) | I schwach<br>markierter<br>Parenchym-<br>zellkerne<br><br>(%) |
|--------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| -1                 | 67                                                   | 78                                            | 19                                                          | 59                                                            |
| 0                  | 51                                                   | 80                                            | 19                                                          | 61                                                            |
| 1                  | 157                                                  | 53                                            | 3                                                           | 50                                                            |
| 2                  | 363                                                  | 76                                            | 10                                                          | 66                                                            |
| 3                  | 424                                                  | 69                                            | 43                                                          | 26                                                            |
| 3,5                | 681                                                  | 84<br>$\pm 3$                                 | 65<br>$\pm 10$                                              | 19<br>$\pm 9$                                                 |
| 4                  | 648                                                  | 83<br>$\pm 8$                                 | 70<br>$\pm 4$                                               | 13<br>$\pm 1$                                                 |
| 4,5                | 455                                                  | 79<br>$\pm 3$                                 | 63<br>$\pm 7$                                               | 16<br>$\pm 10$                                                |
| 5                  | 525                                                  | 76<br>$\pm 4$                                 | 69<br>$\pm 2$                                               | 7<br>$\pm 3$                                                  |
| 5,5                | 474                                                  | 75<br>$\pm 10$                                | 66<br>$\pm 13$                                              | 9<br>$\pm 3$                                                  |
| 6                  | 318                                                  | 59<br>$\pm 2$                                 | 44<br>$\pm 5$                                               | 15<br>$\pm 1$                                                 |
| 6,5                | 298                                                  | 26<br>$\pm 2$                                 | 10<br>$\pm 3$                                               | 16<br>$\pm 15$                                                |
| 7                  | 297                                                  | 38                                            | 28                                                          | 10                                                            |
| 8                  | 414                                                  | 42                                            | 35                                                          | 7                                                             |
| 9                  | 272                                                  | 53                                            | 19                                                          | 34                                                            |

Tab. 9: Die zu Abb. 11 und 12 gehörenden Werte. Stunden p. Inf.: Stunden nach Infusionsende, I: Markierungsindex der Leberparenchymzellkerne als Prozentsatz markierter Parenchymzellkerne von markierten und unmarkierten Parenchymzellkernen, DNA-Sy.d.Par.: DNA-Syntheserate der Leberparenchymzellkerne (Berechnung S. 22 uff.).

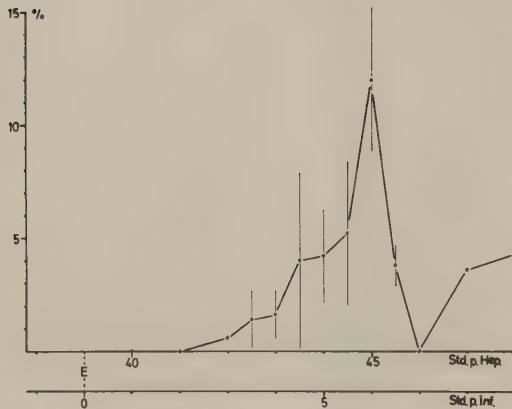


Abb. 13: Markierungsindex der Gallengangszellen in der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion von tritiummarkiertem Thymin in Abhängigkeit von der Zeit nach 25stündiger HU-Infusion mit der Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinate: Prozentsatz markierter Gallengangszellen. Abszisse, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende. E: Infusionsende.

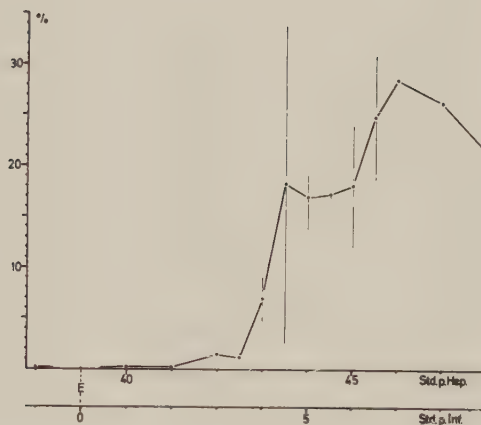


Abb. 14: Markierungsindex der Bindegewebszellen in der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach Injektion von tritiummarkiertem Thymin in Abhängigkeit von der Zeit nach 25stündiger HU-Infusion mit der Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinate: Prozentsatz markierter Bindegewebszellen. Abszisse, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende. E: Infusionsende.

| Stunden<br>p. Inf. | I der<br>Gallengangs-<br>zellen<br>(%) | I der<br>Bindegewebs-<br>zellen<br>(%) | Bemerkung |
|--------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------|
| -1                 | 0,0                                    | 0,2                                    |           |
| 0                  | 0,0                                    | 0,0                                    |           |
| 1                  | 0,0                                    | 0,2                                    |           |
| 2                  | 0,0                                    | 0,2                                    |           |
| 3                  | 0,6                                    | 1,4                                    |           |
| 3,5                | 1,4<br>± 1,3                           | 1,2<br>± 0,4                           | f         |
| 4                  | 1,6<br>± 1,1                           | 7,0<br>± 3,8                           |           |
| 4,5                | 4,0<br>± 4,0                           | 18,4<br>± 15,9                         | f, (n)    |
| 5                  | 4,2<br>± 2,1                           | 16,9<br>± 3,3                          |           |
| 5,5                | 5,2<br>± 3,1                           | 17,3<br>± 1,2                          | f, f      |
| 6                  | 12,0<br>± 3,2                          | 18,2<br>± 6,0                          | f, f      |
| 6,5                | 3,8<br>± 0,9                           | 25,0<br>± 6,2                          | n         |
| 7                  | 0,0                                    | 28,8                                   | n         |
| 8                  | 3,6                                    | 26,4                                   |           |
| 9                  | 4,3                                    | 21,6                                   |           |

Tab. 10: Die zu Abb. 13 und 14 gehörenden Werte. Stunden p. Inf.: Stunden nach Infusionsende, I: Markierungsindex als Prozentsatz markierter Zellkerne von markierten und unmarkierten Zellkernen, Bemerkung, f: Bei der autoradiographischen Auswertung des Leberpräparats eines Versuchstiers festgestellte auffällige Vermehrung von Fettvakuolen, n: Bei der autoradiographischen Auswertung festgestellte Nekrosen, Klammer (): Versehentliche partielle Ligatur des venösen Abflusses der nicht resezierten Restleber bei der 2/3-Hepatektomie.

#### 4. Diskussion

Bei Untersuchungen an Zellkulturen hatte sich gezeigt, daß HU in großen Konzentrationsbereichen gleichbleibende Wirkung hat. So starben in der S-Phase befindliche Hamsterzellen infolge einer Behandlung mit  $10^{-3}$  molarer HU-Lösung (48) ab, während eine Steigerung der Konzentration der Drogenlösung um das 10fache zu keiner weiteren Verminderung der Plating efficiency führte (49). In HeLaS3-Zellkulturen konnte die DNA-Synthese-inhibierende Wirkung einer  $10^{-3}$  molaren HU-Lösung ebenfalls nicht durch Erhöhung der Konzentration auf  $5 \times 10^{-3}$  Mol/l gesteigert werden (30). Ein Verlust der Lebensfähigkeit dieser Zellen stellte sich erst bei einer Konzentration von  $10^{-2}$  Mol/l ein (21, 25) und eine zusätzliche Steigerung des Überlebensverlustes asynchron wachsender HeLa-Zellkulturen blieb bei Drogenkonzentrationen über  $7,9 \times 10^{-2}$  Mol/l aus (25).

In den hier beschriebenen Experimenten wurde Hydroxyharnstoff dauerinfundiert, um eine möglichst konstante Konzentration im Tierorganismus aufrechtzuerhalten. Dabei schienen HU-Dosen über  $0,31 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h in der regenerierenden Rattenleber eine angenähert gleichmäßig starke Hemmung der DNA-Synthese zu bewirken (Abb. 2). Für diese Dosis läßt sich eine HU-Konzentration im Versuchstier während der Infusion von etwa  $0,6 \times 10^{-3}$  Mol/l ausrechnen, und für die maximale geprüfte Dosis von  $5 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h beträgt die Konzentration etwa  $9,5 \times 10^{-3}$  Mol/l (Formel 6 und 9 s.S. 61 und 62). Das würde bedeuten, daß ähnlich wie in HeLa-Zellen in der regenerierenden Rattenleber ein großer HU-Konzentrationsbereich mit konstanter DNA-Synthese-inhibierender Wirkung besteht (30). Wie frühere Arbeiten mit

Hamsterzellkulturen zeigten, ist dabei insbesondere bei der Anwendung größerer Dosen ungewiß, inwieweit Zellen irreversibel geschädigt werden. Die nach dem HU-Block auftretende DNA-Synthese mit  $^3\text{H}$ -TdR-Utilisation beweist allein nicht das Fehlen einer toxischen Wirkung auf die Zellen (49).

Kleinere Dosen als  $0,31 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h zeigten dagegen eine Dosis-Wirkungsbeziehung, wobei die Halbierung der Dosis eine um mehr als das Doppelte gesteigerte DNA-Synthese zur Folge hatte. Wie für das Wachstum eines Karzinoms in vivo (41) schienen also auch für die regenerierende Leber der Ratte beim Unterschreiten einer Grenzdosis die durch die Infusionen aufrecht erhaltenen Blutkonzentrationen der Droge so niedrig gewesen zu sein, daß proportional der geringeren HU-Belastung die DNA-Synthese zunahm.

Weil oberhalb eines Grenzbereichs die höchstmögliche DNA-Synthesehemmung offensichtlich dosisunabhängig war, wurde zur Vermeidung unnötiger zusätzlicher Schädigung von Wechselgeweben (10, 31) auf die Verwendung höchster Dosen verzichtet. Aus dem Versuch 3.1. wurde geschlossen, daß die HU-Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h mit einer rechnerisch ermittelten Konzentration im Versuchstier von  $2,4 \times 10^{-3}$  Mol/l (Formel 6 und 9 s.S. 61 und 62) eine gute DNA-Synthesehemmung in der regenerierenden Rattenleber bewirkt. Bei Untersuchungen über die Beeinflussung der DNA-Synthese in einem Karzinom der Ratte wurde ebenfalls eine gute DNA-Synthesehemmung für HU-Konzentrationen dieser Größenordnung nachgewiesen (41).

Nach einmaligen HU-Injektionen blieb in einem Rattentumor selbst

für die höchsten gemessenen HU-Konzentrationen im Blut der Versuchstiere eine geringe Restaktivität der DNA-Synthese immer nachweisbar (41). Auch durch Dauerinfusionen von HU ließ sich sicher keine vollständige Unterdrückung der DNA-Synthese der regenerierenden Rattenleber herbeiführen. Die DNA-Synthese nahm wahrscheinlich - wenn auch in sehr geringem Umfang - mit der Infusionszeit einer konstanten HU-Dosis etwas zu, wie der Anstieg der ersten, unmittelbar nach Absetzen der Infusionen ermittelten Werte in den Versuchen 3.2. zeigte. Vergleichbares wurde in HEP-2- Zellkulturen beobachtet. Deren DNA-Synthese wurde durch HU ebenfalls zwar sehr stark, aber nicht vollständig gehemmt. Das Produkt der Restsynthese war in diesen Zellen "small-DNA", die nach Auswaschen der Droge Bestandteil normaler DNA wurde. Infolge sehr langer HU-Behandlungszeit nahm der Gehalt an "small-DNA" wieder ab, was von herabgesetzter Überlebenszeit der Zellen auch nach Beseitigung der Droge begleitet war (8). Vielleicht sind die ersten, nach 30stündiger HU-Infusion im Versuch 3.2.4. für die regenerierende Rattenleber ermittelten, überraschend niedrigen Werte ebenfalls nicht nur Zeichen von stärkster DNA-Synthesehemmung sondern auch von tiefgreifenderen Zellschädigungen.

Während die Hemmwirkung auf die DNA-Synthese des mit konstanter Dosierung gegebenen HU mit längerer Infusionszeit bis zur 26-stündigen Behandlungsdauer schwächer wurde, stieg unabhängig von der Infusionsdauer der  $^3\text{H}$ -TdR-Einbau regelmäßig zwei bis drei Stunden nach Infusionsende in größerem Umfang an. Demnach war der Zeitpunkt nach Absetzen der Infusion, zu dem die HU-Konzentration in den Versuchstieren unter einen die normale DNA-

Synthese hemmenden Wert absank, weitgehend unabhängig von der Infusionsdauer; das Zeitintervall für das Absinken der HU-Konzentration im Blut von DNA-Synthese-hemmenden auf nicht mehr hemmend wirkende Konzentrationen war ähnlich kurz wie für ein Karzinom in vivo (41). Diese gerade die DNA-Synthese-inhibierende "Grenzkonzentration" läßt sich angenähert aus der pro Stunde infundierten HU-Dosis ausrechnen, wenn die Halbwertszeit der Droge und ihr Verteilungsvolumen im Versuchstier bekannt sind. Zur Vereinfachung dieser Rechnung wurden einige Annahmen gemacht, deren Gültigkeit für HU-Dauerinfusionen allerdings noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen ist:

1. Die Halbwertszeit der Droge ist während der ganzen HU-Infusions- und anschließenden Untersuchungszeit konstant;
2. Die Halbwertszeit beträgt 60 oder 30 Minuten (41);
3. Pro Zeit wird eine definierte, konstante HU-Menge gegeben;
4. Das Verteilungsvolumen der Droge im Tier verändert sich nicht und beträgt 75% (31).

Ausgangspunkt der Berechnung ist die Überlegung, daß sich bei konstanter Halbwertszeit (Annahme 1) während der Zeit  $t$  nach Gabe einer einmaligen HU-Dosis  $D$  die verbleibende HU-Menge  $M_v$  umgekehrt proportional der Zeit  $t$  als Exponent über der Basis  $b$  verhält, wobei  $t$  die Zeit in Stunden angibt und  $b$  den von einer bestimmten Drogenmenge nach einer Stunde im Tier noch vorhandenen Teil. Bei einer Halbwertszeit der Droge von 60 bzw. 30 Minuten ist  $b$  2 bzw. 4 (Annahme 2).

$$(4) M_v = D \cdot \frac{1}{b^t}$$

Wird HU nun nicht als einmalige Injektion verabreicht, sondern

kontinuierlich während der Zeit  $t$  in konstanter Dosierung  $D$  (Annahme 3), so stellt die Fläche zwischen der Kurve der Formel (4) und der Abszisse zwischen  $0$  und  $t$  die im Versuchstier nach der Zeit  $t$  verbleibende HU-Menge  $M_v \cdot dt$  dar.

$$\begin{aligned} (5) \quad M_v \cdot dt &= D \int_0^t \frac{1}{b^t} \cdot dt \\ &= D \left( - \frac{b^{-t}}{\ln b} \right) \end{aligned}$$

Hinzuzuzählen ist der nach der Zeit  $t$  im Versuchstier noch vorhandene Rest  $M_w$  der HU-Anfangsinjektion von  $1,35 \cdot D$ , die von Beginn der HU-Behandlung an einen für die DNA-Synthese-Inhibition ausreichenden Plasmaspiegel an HU gewährleisten sollte

$$M_w = 1,35 \cdot D \cdot \frac{1}{b^t}$$

und nach Abhängen der Infusion die im Rahmen der abschließenden Kontrolle des Infusionsverlaufs injizierte HU-Menge  $M_x$ , die in  $0,17$  ml der im Perfusor-Infusionsbesteck befindlichen HU-Infusionslösung enthalten war. Die pro Stunde infundierte HU-Dosis  $D$  befand sich in  $0,56$  ml Lösung, so daß  $0,17$  ml HU-Lösung  $0,17/0,56 \cdot D = M_x$  entsprachen. Unmittelbar vor Abhängen der Infusion beträgt also die im Versuchstier enthaltene HU-Gesamtmenge  $M_A$ .

$$(6) \quad M_A = M_w + D \int_0^t \frac{1}{b^t} \cdot dt$$

Nach Abhängen der Infusion beläuft sie sich auf  $M_B$ .

$$(7) M_B = M_x + M_w + D \int_0^t \frac{1}{b^t} \cdot dt$$

Bleibt nun die Halbwertszeit der Droge auch nach Infusionsende konstant, so erhält man für die Zeit  $s$  nach Infusionsende die HU-Menge  $M_y$  im Versuchstier.

$$(8) M_y = M_B \cdot \frac{1}{b^s}$$

Ist das Verteilungsvolumen im Versuchstier immer noch 75% (Annahme 4), so enthält das Blut der Ratte HU in einer tatsächlichen Konzentration von  $HU_k$ .

$$(9) HU_k = \frac{M_y}{75} \cdot 100$$

Die auf der Grundlage dieser Überlegungen durchgeführte Berechnung der HU-Konzentration im Versuchstier unmittelbar vor der Beendigung 7- bzw. 40stündiger HU-Infusionen einer Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h ergibt bei einer Halbwertszeit von 60 Minuten in beiden Fällen etwa  $2,4 \times 10^{-3}$  Mol/l. In Folge der abschließenden HU-Injektion nach der Beendigung der Infusion steigt sie auf  $2,9 \times 10^{-3}$  Mol/l. Die Halbwertszeit von 60 Minuten wurde für HU in der 2/3-hepatektomierten Ratte nachgewiesen (41).

Bei nicht operierten, normalen Tieren lag sie für HU-Konzentrationen unter  $1,3 \times 10^{-3}$  Mol/l bei 35 Minuten (31) und stieg auf 60 Minuten an, wenn die HU-Plasmakonzentration  $2 \times 10^{-3}$  Mol/l überschritt (31). Schließt man nicht aus, daß auch in der 2/3-hepatektomierten Ratte unter HU-Dauerinfusionen und während des

Absinkens der HU-Konzentration im Blut nach Beendigung der Behandlung die Halbwertszeit vielleicht absank, so erniedrigt sich die nach Infusionsende erhaltene Blutkonzentration des HU auf  $2 \times 10^{-3}$  Mol/l, wenn die Verkürzung der Halbwertszeit auf 30 Minuten unterstellt wird. Für die 2. bis 3. Stunde nach Infusionsende läßt sich für die längere Halbwertszeit eine Konzentration von 0,7 bis  $0,35 \times 10^{-3}$  Mol/l errechnen, für die kürzere Halbwertszeit beträgt sie 0,12 bis  $0,03 \times 10^{-3}$  Mol/l. Für die regenerierende Rattenleber liegt demnach die niedrigste DNA-Synthese-hemmende HU-Konzentration zwischen  $3$  und  $70 \times 10^{-5}$  Mol/l. An anderer Stelle wurde für die dritte Stunde nach einmaliger HU-Injektion von  $6,6 \times 10^{-3}$  Mol/kg KG starke Hemmung der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber festgestellt (47). Für diesen Zeitpunkt läßt sich (Formel 4 und 9 s.S. 60 und 62) für die Halbwertszeit von 30 - 60 Minuten eine Blutkonzentration von 1,4 bis  $11 \times 10^{-4}$  Mol/l errechnen. Für denselben Zeitpunkt würde die HU-Konzentration nach einer Dosis von  $1,3 \times 10^{-3}$  Mol/kg KG bei 2 bis  $16 \times 10^{-5}$  Mol/l liegen. Sie wirkte nicht mehr DNA-Synthese-hemmend (47). Für die regenerierende Rattenleber könnte sie etwas höher liegen.

Es soll an dieser Stelle jedoch nochmals darauf hingewiesen werden, daß die Richtigkeit der eingangs genannten Voraussetzungen für diese Berechnungen nicht uneingeschränkt angenommen werden kann, so daß eine quantitative Aussage über die DNA-Synthese-hemmende Konzentration von HU an der regenerierenden Rattenleber während der HU-Dauerinfusion nicht möglich ist. Genauere Untersuchungen zur Pharmakokinetik des HU unter den spezifischen

Versuchsbedingungen sind hierfür erforderlich.

Durch Inkubation von HeLa-Zellen mit Amethopterin für 16 Stunden konnten nach Zugabe von Thymidin 85% der Zellen während 4 Stunden zur Proliferation gebracht werden, ohne daß es zu einer Abnahme der Überlebensfähigkeit der Zellen kam (43). In teilsynchronisierten Hamsterzellkulturen stieg der Markierungsindex von 55% der Kontrollen ohne HU auf 83% (48). In anderen Experimenten mit denselben Zellen stieg der Markierungsindex auf 85%, wenn die Zellen 6 Stunden nach ihrer Isolation in der Mitose für 2,5 Stunden HU-inkubiert wurden (49).

Der durch 5stündige HU-Einwirkung erzielte Markierungsindex eines Karzinoms der Ratte von über 75% konnte durch Verlängerung des HU-Blocks auf 10 Stunden nicht gesteigert werden. Möglich war eine Steigerung nur, wenn ein zweiter DNA-Synthese-inhibierender HU-Puls vor dem Eintritt der Zellen in die nächste S-Phase gegeben wurde (41). In dem hier beschriebenen Versuch 3.3. wurde für die regenerierende Rattenleber nach 14,5stündigen HU-Infusionen, die in der 14. Stunde nach 2/3-Hepatektomie begannen, ein Markierungsindex von 63% erreicht. Er war von einem hohen Radioaktivitätsgehalt im säureunlöslichen Präzipitat begleitet. Für längere HU-Behandlungen bis zu 30 Stunden stieg zwar der Markierungsindex auf 80% an, gleichzeitig kam es jedoch zu einer Erniedrigung der Radioaktivität im säureunlöslichen Präzipitat. Ursachen könnten das Verfehlen eines vielleicht sehr kurzen Zeitraums höchster  $^3\text{H}$ -TdR-Inkorporation nach Infusionsende oder manifeste Zellschäden durch "Unbalanced Growth" gewesen sein. Bis zur 15. Stunde nach 2/3-Hepatektomie wird von der regenerierende

Leber DNA nicht in nennenswertem Umfang synthetisiert (34). Danach passiert bis zur 34. Stunde der weitaus größte Teil der Hepatocyten die S-Phase; nur eine kleine Zahl läppchenzentraler Zellen muß sie noch durchlaufen (35). Falls die Synthese von RNA und säureunlöslichen, cytoplasmatischen Proteinen unter den HU-Dauerinfusionen von der 14. bis 40,0. Stunde nach 2/3-Hepatektomie unbeeinträchtigt bleibt, wie für einmalige HU-Dosen nachgewiesen wurde (47, 55), so könnte sich mit längerer Infusionsdauer stärker ein Stadium des "Unbalanced Growth" ausgebildet haben. Zum Vergleich ließen sich HEP-2-Zellen und während 16-19 Stunden mit HU behandelte HeLaS3-Zellen anführen. Die ersteren verloren ihre Überlebensfähigkeit, wenn sich die HU-Behandlung über ein längeres Intervall hin erstreckte, als ihrer Generationszeit entsprach (8). Die HeLaS3-Zellen, die eine Zellzykluszeit von etwa 21 Stunden haben, zeigten dagegen bereits eine Abnahme der Plating efficiency, wenn sie länger als 16 - 19 Stunden nach ihrer mitotischen Selektion HU-inkubiert wurden (21, 22, 30). Welche HU-Behandlungsdauer Hepatocyten der regenerierenden Rattenleber ohne bleibende Schäden tolerieren, kann hier nicht entschieden werden, weil Experimente an Hamsterzellkulturen gezeigt haben, daß DNA-Synthese einer vorher durch HU gehemmten Zelle kein Beweis für ihr Überleben ist (49).

Beim Vergleich der HU-infundierten mit den  $^3\text{H}$ -TdR-infundierten Tieren fällt auf, daß in der säureunlöslichen Fraktion der letztgenannten die Radioaktivität mit längerer Infusionszeit stärker zunahm als in den HU-infundierten Tieren. Demgegenüber stieg der Markierungsindex der mit radioaktiver Lösung infundierten Tiere zwar ebenfalls an, blieb jedoch niedriger als bei den HU-Tieren.

In Leukämiezellen, die Mäusen i.p. inokuliert worden waren, ließ sich mit höheren  $^3\text{H}$ -TdR-Dosen die Radioaktivität steigern, was jedoch für Dosen von  $2\text{ }\mu\text{Ci/g KG}$  und mehr von dosisproportionalen Anstieg der Absterberate begleitet war (18). Daß die DNA des Zellkerns sehr strahlenempfindlich ist, zeigte die beträchtliche Zunahme der Chromosomenaberrationen in Leukocytenkulturen nach 3stündiger  $^3\text{H}$ -TdR-Behandlung mit  $0,25\text{ }\mu\text{Ci/ml}$  (11). Dosen bis zu  $3,5\text{ }\mu\text{Ci/g KG}$  überlebten Mäuse bei einer Untersuchungszeit von 90 Tagen. In diesen Experimenten wurden konstante  $^3\text{H}$ -TdR-Mengen mit unterschiedlichen Radioaktivitätsdosen zugeführt, wobei für höhere Dosen dem zunächst stärkeren Anstieg eine schnellere Elimination der Radioaktivität im Wechselgewebe folgte. Es kam aber andererseits nach einmaligen  $^3\text{H}$ -TdR-Dosen von nur  $1\text{ }\mu\text{Ci/g KG}$  zum Absterben von Spermatocyten in den Testes der Maus (29). Die Hepatocyten der wachsenden, 3 Wochen alten Ratte zeigten Störung des regelmäßigen Replikationszyklus und Verminderung der Mitosenzahl, wenn  $^3\text{H}$ -TdR einmalig in einer Dosierung von  $2\text{ }\mu\text{Ci/g KG}$  und mehr gegeben wurde (32). Drei Wochen nach dem  $^3\text{H}$ -TdR-Puls enthielt die normalerweise in diesem Alter vorwiegend diploide Hepatocytenpopulation zahlreiche tetra- und oktoploide Leberzellen. Zwei Wochen später durchgeführte Untersuchungen ergaben zusätzlich einen gegenüber der Norm fast um die Hälfte gesunkenen Prozentsatz DNA synthetisierender Leberparenchymzellen. Für die  $^3\text{H}$ -TdR-Dosis von  $1\text{ }\mu\text{Ci/g KG}$  wurden diese Veränderungen nicht beobachtet (32, 33). Es wurde in den hier beschriebenen Versuchen deshalb davon ausgegangen, daß die Pulsmarkierung von  $0,8\text{ }\mu\text{Ci/g KG}$   $^3\text{H}$ -TdR bei erwachsenen Ratten keine wesentliche Beeinträchtigung der Proliferation der regenerierenden Rattenleber bewirkt. Erhielten jung

Ratten 20 Stunden nach 2/3-Hepatektomie  $^3\text{H}$ -TdR in einer Dosierung von  $1\text{ }\mu\text{Ci/g KG}$ , so wurden in den darauffolgenden 24 Stunden eine verminderte Lebergewichtszunahme sowie verzögertes Auftreten des Mitose-Peaks um 18 Stunden beobachtet, was als Erscheinung sublethaler Strahlenbelastung interpretiert wurde (13). Sicherlich blieb im Versuch 3.3. die radioaktive Strahlung infolge des dauerinfundierten  $^3\text{H}$ -TdR, dessen Gesamtdosis nach 12, 19 und 25 Stunden Infusion 2,5, 3,9 und  $5,1\text{ }\mu\text{Ci/g KG}$  betrug, nicht ohne hemmende Wirkung auf die Proliferationsfähigkeit der Leber. Jedenfalls trat in den Leberzellen der wachsenden Ratte nach einer  $^3\text{H}$ -TdR-Injektion von  $2\text{ }\mu\text{Ci/g}$  eine Verdoppelung von  $t_c$  in Erscheinung, die in erster Linie auf eine Verlängerung der  $G_1$ -Phase zurückzuführen war (33).

Bei der genaueren Untersuchung der Wirkung 25stündiger HU-Infusionen auf die regenerierende Rattenleber im Versuch 3.4. fiel während und unmittelbar nach Infusionsende ein hoher Markierungsindex auf, der von geringer Radioaktivität in säureunlöslichem Präzipitat und DNA begleitet war. Ursache kann eine unterschiedliche  $^3\text{H}$ -TdR-Inkorporation aufgrund von DNA-repair-Synthese oder unvollständige DNA-Synthese-Inhibition durch HU sein. So lief in HeLa-Zellen die DNA-repair-Synthese unter HU-Einwirkung weiter (5) und bei HEp-2-Zellen entstand in der Anwesenheit von HU eine im alkalischen Sucrose-Gradienten langsam sedimentierende "small-DNA", die nach Auswaschung der Droge in schnell sedimentierenden DNA-Aggregaten nachzuweisen war (8). In vivo wurde bei Behandlung eines Karzinoms der Ratte mit HU eine DNA-Restsynthese beobachtet. Autoradiogramme zeigten nach Langzeitexposition, daß die  $^3\text{H}$ -TdR-Inkorporation nicht auf einzelne

Zellen beschränkt war, sondern alle in der S-Phase befindliche Zellen betraf (41).

In welchem Umfang die Synthese extranucleärer DNA unter diesen Versuchsbedingungen abläuft, wurde nicht untersucht. Der  $^3\text{H}$ -TdR-Einbau in die cytoplasmatische DNA von HeLa-Zellen war durch HU kaum beeinträchtigt (53). Die Synthese mitochondrialer DNA in der regenerierenden Rattenleber und E. coli-Kulturen zeigte bei Kurzzeitexposition eine geringere Empfindlichkeit gegenüber HU als die der Kern-DNA (3, 4).

Die Spezifische Aktivität der DNA und die Radioaktivität des Perchlorsäurepräzipitats nach 25stündiger HU-Infusion zeigten nach Erreichen höchster Werte einen stufenförmig verlaufenden Abfall, der durch statistische Ungenauigkeiten verursacht worden sein könnte. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die DNA-Syntheseaktivität der Zellen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abnahm, oder daß mehrere DNA-synthetisierende Zellpopulationen bestanden, die mit einem zeitlichen Abstand von 1,0 - 1,5 Stunden die S-Phase passierten. So zeigt der Markierungsindex stark markierter Hepatocyten zwei Maxima mit der zeitlichen Differenz von einer Stunde. Diese beiden Höchstwerte könnten durch zwei Hepatocyten-Subpopulationen unterschiedlicher Progression in die S-Phase während der HU-Behandlung verursacht worden sein. Daneben erreicht der Markierungsindex der Bindegewebszellen zum ersten Mal höhere Werte zu einer Zeit, während der die Spezifische Aktivität der Leber nicht nennenswert absinkt, so daß ihre Mitwirkung an der Ausbildung des schwer zu deutenden Kurvenverlaufs nicht auszuschließen ist. Die unterschiedliche

Abnahme der DNA-Synthese in den Zellen könnte Folge einer plötzlichen Reaktivierung des Enzyms sein, das durch HU während längerer Zeit gehemmt war: Theoretisch könnte durch die Einwirkung einer Hemmsubstanz (hier: HU) auf ein Enzym (hier: Ribonucleosid - Diphosphat - Reduktase (23) ) die Reaktivierung oder - bei irreversibeler Schädigung - die Neusynthese des Enzyms stimuliert werden. Ebenso könnten nachgeschaltete Enzyme (Thymidylat - Synthetase, Thymidinkinase, Cytidinkinase) durch Mangel an Produkten des gehemmten Enzyms in gesteigerter Konzentration vorliegen, während die Konzentration oder Aktivität vorgeschalteter Enzyme (zur Synthese der Cytidin- und Uridinphosphate) analog durch Anhäufung von Substrat des gehemmten Enzyms geringer wäre. Nach Beseitigung des Blocks käme es zur schnellen Metabolisierung des Substratüberschusses, was in dem kurzzeitigen Peak der Spezifischen Aktivität der DNA zum Ausdruck kommen würde. Die danach erfolgende Begrenzung der DNA-Synthese durch die vorgeschalteten Enzyme könnte zu dem stufenförmigen Abfall der Kurve führen. Als Zeichen wieder aufeinander abgestimmter Enzymaktivitäten wären dann die am Ende des Untersuchungszeitraums auffallenden erhöhten Werte zu interpretieren. Beweise für die Hypothese fehlen jedoch. So war die DNA-Polymeraseaktivität in HeLaS3-Zellen nach 24stündiger HU-Einwirkung sogar - wenn auch in geringem Maße - gehemmt (21) und die Phosphorylierung von Thymidylaten unter HU-Behandlung unverändert (58). Lediglich die Thymidin-Kinaseaktivität in HeLaS3-Zellen zeigte nach 24 stündiger HU-Einwirkung eine Steigerung um das Dreifache (21).

Um mehr Klarheit über den Ablauf der DNA-Synthese in der Hepa-

tocytenpopulation zu erhalten, wurde ihre DNA-Syntheserate berechnet (Abb. 11). Auch bei der so erhaltenen Kurve behielt der abfallende Kurvenast seine stufige Form, jedoch sanken die Werte weniger tief als die vergleichbaren der Spezifischen Aktivität der DNA. Die erhöht bleibenden Werte zum Schluß der Untersuchungszeit könnten dafür sprechen, daß diese Hepatocyten am Ende der Untersuchung die S-Phase noch nicht beendet hatten. Trotz des hohen Markierungsindex der Bindegewebszellen spielt deren Berücksichtigung bei dieser Berechnung der DNA-Syntheserate der Hepatocyten eine untergeordnete Rolle, wie die in Abb. 1 ebenfalls eingezeichnete Kurve des unkorrigierten Quotienten aus Spezifischer Aktivität der DNA und Markierungsindex der Hepatocyten zeigt. Immerhin ließ sich so für das Zeitintervall, in dem sich Bindegewebszellen in der S-Phase befanden, die Berechnung einer fälschlich zu hohen DNA-Syntheserate der Hepatocyten vermeiden. Die Ploidie der Leberparenchymzellen erhöht sich von diploiden ( $2n$ ) Zellkernen ausgehend vor allem während des Heranwachsens der Ratte (2). In den hier beschriebenen Versuchen wurde mit erwachsenen Ratten von 200 g KG und mehr gearbeitet. Sie besitzen bereits ein sehr stabiles Kernmuster, das sich zu ca. 87, 11 und 2% aus tetra-, di- und oktoploiden Zellkernen zusammensetzt (15, 28). Die sich daraus ergebenden Ploidieverhältnisse wurden bei der Berechnung der DNA-Syntheserate zu berücksichtigen versucht. Die Kernzahl pro Zelle, die in enger Beziehung zur Ploidieerhöhung wechselt (2, 27), spielte bei der Berechnung keine Rolle, weil bei der autoradiographischen Auswertung der Prozentsatz markierter Zellkerne und nicht markierter Zellen bestimmt wurde. 2/3-Hepatektomie induziert in der Leber der erwachsenen

Ratte Wechsel der Kerne zu höheren Ploidiestufen, die auch zwei Monate nach der Operation noch nachweisbar sind (20). Dabei finden sich in den ersten 24 Stunden nach 2/3-Hepatektomie in der normalen regenerierenden Rattenleber keine Veränderungen (27). Am 2. bis 4. Tag nach der Operation vermehren sich vor allem die oktoploiden Hepatocytenkerne, während gleichzeitig die zweikernigen Zellen der jeweils niedrigeren Ploidieklassen zahlenmäßig geringer werden (15, 27). Dieser beginnende Wechsel zur höheren Ploidie, der sich in den Autoradiographien durch radioaktiv-markierte Zellen zwar darstellte, über die Bestimmung der Spezifischen Aktivität der DNA aber nicht erfaßt werden konnte, blieb bei der Berechnung der DNA-Syntheserate der Hepatocytenkernpopulation unberücksichtigt. Für den weiteren Verlauf der Untersuchung wurde davon ausgegangen, daß dieser Fehler mit dem Beginn der DNA-Synthese in den Bindegewebszellen teilweise wieder ausgeglichen wurde.

Bindegewebszellen treten zu einem Zeitpunkt in die S-Phase ein, zu dem die Höchstwerte sowohl der Spezifischen Aktivität der DNA als auch des Markierungsindex aller Hepatocyten bereits erreicht sind. Dieser verzögerte Eintritt in die S-Phase ist auch aus der Abb. 16 ersichtlich, in der die mit der Formel 1 (s.S. 25) errechneten Werte der Spezifischen Aktivität der DNA von Parenchym- und Bindegewebszellen getrennt graphisch dargestellt sind. Für die Spezifische Aktivität der Bindegewebszellen mußte die Formel 1 dazu etwas abgewandelt werden.

$$(10) \text{ Spez. Akt. d. DNA}_b = \frac{I_b}{4I_p + I_b} \cdot \text{Spez. Akt. d. DNA}_L$$

Der gegenüber den Hepatocyten vergleichsweise späte Eintritt der

Stromazellen in die S-Phase kann mit einem im Vergleich zur Serumkonzentration früherem Absinken der HU-Konzentration in Cytoplasma und Kern der Leberparenchymzellen erklärt werden. Die Fähigkeit der Leber, HU zu reduzieren, ist bekannt (7), und es ist anzunehmen, daß für die Reduktion des HU relevante Enzyme vorwiegend in der Mitochondrialfraktion (7) der Hepatocyten lokalisiert sind. Wahrscheinlich kann so auch der nur während der ersten zwei Stunden nach ihrer Injektion mögliche biochemische Nachweis von HU im Homogenat der regenerierenden Rattenleber nach 2/3-Hepatektomie erklärt werden (41). Die Gallengangszellen könnten infolge der Serumkonzentration oder wegen erhöhter Empfindlichkeit auf HU noch länger nahe der  $G_1$ -S-Grenze inhibiert worden sein.

Es ist daneben aber auch nicht auszuschließen, daß die Proliferation einer Zellart vielleicht durch andere beeinflusst wird. In der normalen regenerierenden Rattenleber setzt die DNA-Synthese der Gallengangszellen 8 bis 12 Stunden nach Beginn der DNA-Synthese der Hepatocyten ein (14), und auch aus den hier beschriebenen Versuchen könnten Hinweise für die Abhängigkeit des Wachstums einer Zellart von anderen Zellarten desselben Organs abgeleitet werden. So erfolgt der erste steile Anstieg des Markierungindex der Bindegewebszellen, nachdem der der Parenchymzellkerne seinen Höchstwert erreicht hatte. Eineinhalb Stunden später steigt er erneut im Anschluß an den Höchstwert des der Gallengangszellen. Ob die Proliferation der Bindegewebszellen tatsächlich von der Passage bestimmter Zellzyklusabschnitte der Hepatocyten und Gallengangszellen abhängig ist und ob das Wachstum der Stromazellen durch physikalische Veränderungen ihrer Umgebung infolge zahlen-

mäßiger Vermehrung einer anderen Zellart beeinflusst wird (14), kann wegen des begrenzten Umfangs der Untersuchungen in dieser Richtung hier nicht entschieden werden.

Während sich die Gallengangs- und Bindegewebszellen in der S-Phase befinden und die Hepatocyten ebenfalls zum großen Teil noch DNA synthetisieren, wird zum Ende des Untersuchungszeitraums hin ein Anstieg des Mitoseindex der Leberparenchymzellen gefunden. Der Mitoseindex betrug in der normalen regenerierenden Rattenleber zur Zeit des Maximums zwischen der 28. und 36 Stunde nach 2/3-Hepatektomie etwa 8% (15, 54). In den vorliegenden Versuchen wurde im Anschluß an 25stündige HU-Infusionen kein Wert über 5,5% beobachtet. Der Untersuchungszeitraum nach Infusionsende war zu kurz, um alle möglicherweise auftretenden Mitosen sichtbar werden zu lassen. Außerdem ist die zeitliche Variation der  $G_2$ -Phase zu groß, um eine höhere Synchronie zuzulassen (39). In Hamsterzellkulturen wurde ein Verlust der mitotischen Teilungsfähigkeit aufgrund langer HU-Einwirkung festgestellt (49). Ähnlich sich auswirkende, durch ein "Unbalanced Growth" entstandene Zellschäden können für die Hepatocyten der regenerierenden Rattenleber nicht ausgeschlossen werden. Immerhin ist jedoch anzunehmen, daß die hier in den autoradiographischen Präparaten gefundenen Mitosen mit größerer Wahrscheinlichkeit Leberzellen anzeigen, die weitgehend unbeschadet die HU-Behandlung überlebten. Daß die Passage der  $G_2$ -Phase und der Eintritt in die Mitose bei einem großen Teil der Hepatocyten trotz HU-Behandlung nicht beeinträchtigt sind, zeigte das Auflaufen von über 40% der Zellen in der Metaphase

unter Vincristin-Infusionen im Anschluß an HU-Dauerinfusion (39).

Wie in der HU-behandelten regenerierenden Rattenleber traten in der regenerierenden Mäuseleber, deren Läppchenzentrum zu 40 - 45% durch eine  $\text{CCl}_4$ -Injektion zerstört worden war, starke Streuungen des Mitoseindex auf (46). Dabei gingen aus nur 10% der Mitosen, die in der Leber  $\text{CCl}_4$ -behandelter Mäuse beobachtet wurden, zwei Tochterzellen gleicher Ploidie hervor. Die Regeneration erfolgte im übrigen vorwiegend durch Polyploidisierung und Zellhypertrophie (12). Kenntnisse über derartige Veränderungen, die im Fall der  $\text{CCl}_4$ -Leber der Maus zur Entwicklung eines quantitativen Modells führten (24), liegen für die HU-behandelte regenerierende Leber der Ratte nicht vor. Unbekannt ist auch, in welchem Umfang neben der gegenüber HU-Intoxikation recht resistenten Leber Wechselgewebe unter HU-Dauerbehandlung geschädigt werden (10, 31). Auch über die zeitliche Entwicklung und hormonelle Beeinflussung der Equilibrierung des sehr wahrscheinlich veränderten Kernmusters der Leberzellen (50) weiß man nichts.

Die hier beschriebene Methode zur Synchronisation der DNA-Synthese von Hepatocyten wurde in Kurzzeitversuchen mit dem Ziel angewendet, eine unterschiedliche zellzyklusabhängige Empfindlichkeit der Leber-DNA gegenüber karzinogeninduzierter Basen-Alkylierung quantitativ zu erfassen (38). Auch für Untersuchungen, die sich über längere Zeit hin erstrecken, könnte diese Versuchsanordnung - vielleicht in abgewandelter Form - eingesetzt werden. Sowohl nach 15,5- als auch 22stündigen HU-Infusionen mit  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h von der 14. Stunde nach 2/3-Hepatektomie an überlebten zwei Drittel

der Versuchstiere. Für diese HU-Behandlungen wurden  $^3\text{H}$ -TdR-Markierungsindices von 63 und 73% der Hepatocyten ermittelt. Es ist zu erwarten, daß regenerierende Rattenleber dieses Synchronisationsgrades als Modell für die Analyse zellzyklusspezifischer Wirkungen auf proliferierendes, hochdifferenziertes Normalgewebe geeignet ist.

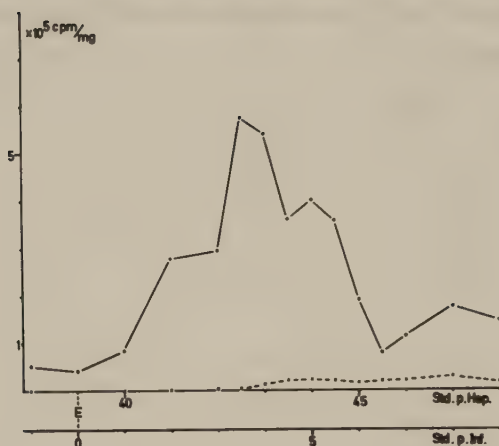


Abb. 16: Spezifische Aktivität der DNA der Hepatocyten (o—o) und Bindegewebszellen (x—x) in der regenerierenden Rattenleber 60 Minuten nach der Injektion tritiummarkierten Thymidins in Abhängigkeit von der Zeit nach 25stündiger HU-Infusion mit der Dosis von  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h. Ordinate: Spezifische Aktivität der DNA in Impulsen pro Minute und Milligramm. Abszisse, oben: Zeit in Stunden nach 2/3-Hepatektomie, unten: Zeit in Stunden nach Infusionsende. E: Infusionsende.

| Stunden<br>p. Inf. | Quotient<br>Sp. Akt./I<br>( $\times 10^3$<br>dpm/mg) | Spez. Akt.<br>d. DNA <sub>p</sub><br>( $\times 10^3$<br>cpm/mg) | Spez. Akt.<br>d. DNA <sub>b</sub><br>( $\times 10^3$<br>cpm/mg) |
|--------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| -1                 | 67                                                   | 51,9                                                            | 0,1                                                             |
| 0                  | 51                                                   | 41,0                                                            | 0,0                                                             |
| 1                  | 157                                                  | 82,9                                                            | 0,1                                                             |
| 2                  | 363                                                  | 275,8                                                           | 0,2                                                             |
| 3                  | 426                                                  | 292,5                                                           | 1,5                                                             |
| 3,5                | 683                                                  | 572,0                                                           | 2,0                                                             |
| 4                  | 661                                                  | 537,7                                                           | 11,3                                                            |
| 4,5                | 481                                                  | 359,0                                                           | 21,0                                                            |
| 5                  | 554                                                  | 398,8                                                           | 22,2                                                            |
| 5,5                | 501                                                  | 355,5                                                           | 20,5                                                            |
| 6                  | 342                                                  | 187,5                                                           | 14,5                                                            |
| 6,5                | 369                                                  | 77,4                                                            | 18,6                                                            |
| 7                  | 353                                                  | 112,7                                                           | 21,3                                                            |
| 8                  | 479                                                  | 173,7                                                           | 27,3                                                            |
| 9                  | 300                                                  | 144,3                                                           | 14,7                                                            |

Tab. 11: Zu Abb. 11 und Abb. 16 gehörende Werte. Stunden p. Inf.: Stunden nach Infusionsende, Quotient Sp. Akt./I: Unkorrigierter Quotient aus Spezifischer Aktivität der DNA und Markierungsindex der Hepatocytenkerne  $\times 100$ , Spez. Akt. d. DNA: Spezifische Aktivität der DNA der Leberparenchymzellkerne, <sup>p</sup>Spez. Akt. d. DNA<sub>b</sub>: Spezifische Aktivität der DNA der Bindegewebszellen.

## 5. Zusammenfassung

In der regenerierenden Rattenleber führen vierzehn Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie beginnende, intravenöse Hydroxyharnstoff-Infusionen zur Hemmung der DNA-Synthese. Für den Bereich niedriger Hydroxyharnstoff-Dosen steigt die Hemmung der DNA-Synthese proportional der Dosis. Steigerung der Dosis über  $0,62 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h hat bei kurzen Infusionszeiten keine wesentliche Verstärkung des Hemmeffekts zur Folge. Bei Verlängerung der Infusionszeit mit einer konstanten Dosis wird deren Hemmeffekt auf die DNA-Synthese geringer. Nach Infusionsende steigt der Einbau von tritiummarkiertem Thymidin in die DNA an und erreicht zwischen der dritten und fünften Stunde ein Maximum. Beginn der DNA-Synthese und Zeitpunkt ihres Maximums nach Hydroxyharnstoff-Block sind abhängig von der Infusionsdauer. Der autoradiographisch ermittelte, höchste  $^3\text{H}$ -Thymidin-Markierungsindex der Hepatocyten im Anschluß an Hydroxyharnstoff-Infusionen mit  $1,25 \times 10^{-3}$  Mol/kg/h steigt zwischen 7,5- und 30stündigen Infusionen von 40 auf 80% an. Eine auf die Länge der Zellzykluszeit ausgedehnte Infusionszeit ergibt Anzeichen toxischer Schädigung der Leber. 22stündige Infusionen überleben etwa 60% der Tiere. Biochemische und autoradiographische Untersuchungen des Verlaufs der DNA-Synthese im Anschluß an 25stündige Hydroxyharnstoff-Infusionen ergeben Höchstwerte für den Einbau von tritiummarkiertem Thymidin nur während eines relativ kurzen Zeitraums. Die Ursache des sich ausschließenden stufenförmigen Absinkens auf niedrige Werte ist nicht vollständig geklärt. Auch neun Stunden nach

Beendigung der Hydroxyharnstoff-Infusionen wird DNA in der Leber noch synthetisiert. Nach Abklingen der DNA-Synthese in den Hepatocyten treten Mitosen auf. Es werden Hinweise für die Abhängigkeit der Proliferation der nicht hepatozellulären Populationen vom proliferativen Zustand der Hepatocyten gefunden. Das entwickelte Modell der synchron DNA-replizierenden Hepatocyten in vivo bietet günstige Voraussetzungen für Untersuchungen der Wirkung von Pharmaka auf die DNA-Synthese eines hochdifferenzierten Organs.

## 6. Literatur

1. Adamson, R.H., Ague, S.L., Hess, S.M., Davidson, J.D.: The Distribution, Excretion and Metabolism of Hydroxyurea- $C^{14}$ . J. Pharmacol. Exptl. Therapy 150, 322-327 (1965).
2. Alfert, M., Geschwind, I.I.: The Development of Polysomaty in Rat Liver. Exp. Cell. Res. 15, 230-270 (1958).
3. Bagnet-Mathieu, K., Goutier, R., Baes, C.: Differential Response of Mitochondrial and Nuclear DNA Synthesis to Hydroxyurea in Normal and Regenerating Rat Liver. Biochem. Pharmacol. 20, 141-149 (1971).
4. Bosman, H.B.: Macromolecular Synthesis in E. Coli, Isolated Mitochondria and L5178Y Cells in the Presence of Hydroxyurea or Formamidoxim. Chem.-Biol. Interactions 3, 429-437 (1971).
5. Brandt, W.N., Flamm, W.G., Bernheim, E.J.: The Value of Hydroxyurea in Assessing Repair Synthesis of DNA in HeLa Cells. Chem.-Biol. Interactions 5, 327-339 (1972).
6. Burton, K.: A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamin Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. Biochem. J. 62, 315-323 (1956).
7. Colvin, M., Bono, V.H.: The Enzymatic Reduktion of Hydroxyurea to Urea by Mouse Liver. Cancer Res. 30, 1516-1519 (1970).
8. Coyle, M.B., Strauss, B.: Cell Killing and the Accumulation of Breaks in the DNA of HEp-2 Cells Incubated in the Presence of Hydroxyurea. Cancer Res. 30, 2314-2319 (1970).

9. Eidinoff, M.L., Rich, M.A.: Growth Inhibition of a Human Tumor Cell Strain by 5-Fluoro-2-Deoxyuridine: Time Parameters for Subsequent Reversal by Thymidine. *Cancer Res.* 19, 521-524 (1959).
10. Farber, E., Baserga, R.: Differential Effects of Hydroxyurea on Survival of Proliferating Cells. *Cancer Res.* 29, 136-139 (1969).
11. Geard, C.R.: Chromosomal Aberrations in Three Successive Cell Cycles of *Wallabia bicolor* Leucocytes after Tritiated Thymidine Incorporation. *Radiation Res.* 61, 118-127 (1975).
12. Gerhard, H., Schultze, B., Maurer, W.: Quantitative Untersuchungen über Wachstum und Polyploidisierung in der Regeneration der CCl<sub>4</sub>-Leber der Maus. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 14, 345-359 (1973).
13. Grisham, J.W.: Inhibitory Effect of Tritiated Thymidine on Regeneration of the Liver in the Young Rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105, 555-558 (1960).
14. Grisham, J.W.: A Morphologic Study of Deoxyribonucleic Acid Synthesis and Cell Proliferation in Regenerating Rat Liver; Autoradiography with Thymidine-H<sup>3</sup>. *Cancer Res.* 22, 842-849 (1962).
15. Grundmann, E., Bach, G.: Amitosen, Endomitosen und Mitosen nach partieller Hepatektomie. *Beitr. Path. Anat.* 123, 144-172 (1960).
16. Higgins, G.M., Anderson, R.M.: Experimental Pathology of the Liver. I. Restoration of the Liver of the White Rat Following Partial Surgical Removal. *Arch. Path.* 12, 186-202 (1931).

17. Hill, R.B., Gordon, J.A.: Effect of Hydroxyurea Analogues in Regenerating Rat Liver. *Exp. Molec. Pathol.* 9, 71-76 (1968).
18. Hofer, K.G., Huges, W.L.: Radiotoxicity of Intranuclear Tritium, 125 Iodine and 131 Iodine. *Radiation Res.* 47, 94-109 (1971).
19. Jacobs, S.J., Rosenkranz, H.S.: Detection of a Reactive Intermediate in the Reaction between DNA and Hydroxyurea. *Cancer Res.* 30, 1084-1094 (1970).
20. James, J., Schopmann, M., Delfgaaw, P.: The Nuclear Pattern of the Parenchymal Cells of the Liver after Partial Hepatectomy. *Exp. Cell. Res.* 42, 375-379 (1966).
21. Kim, J.H., Gelbard, A.S., Perez, A.G.: Action of Hydroxyurea on the Nucleic Acid Metabolism and Viability of HeLa Cells. *Cancer Res.* 27, 1301-1305 (1967).
22. Kim, J.H., Perez, A.G., Djordjevic, B.: Studies on Unbalanced Growth in Synchronized HeLa Cells. *Cancer Res.* 28, 2443-2447 (1968).
23. Krakoff, I.H., Brown, N.C., Reichard, P.: Inhibition of Ribonucleoside Diphosphate Reductase by Hydroxyurea. *Cancer Res.* 28, 1559-1565 (1968).
24. Maurer, W., Gerhard, H., Schulze, B.: Quantitatives Modell der Regeneration der  $\text{CCl}_4$ -Leber der Maus. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 14, 361-371 (1973).
25. Mauro, F., Madoc-Jones, H.: Age Responses of Cultured Mammalian Cells to Cytotoxic Drugs. *Cancer Res.* 30, 1397-1408 (1970).

26. Munro, H.N., Fleck, A.: The Determination of Nucleic Acids. Methods of Biochemical Analysis (ed. by D. Glick), vol. XIV, p. 113-176 New York - London - Sidney; Interscience Publishers, a Division of John Wiley & Sons (1966).
27. Nadal, C., Zajdela, F.: Polyploidie Somatique dans le Foie de Rat. Exp. Cell. Res. 42, 99-116 (1966).
28. Noara, H.: Microspectrophotometry of Cell Nuclei Stained with the Feulgen Reaktion IV. Formation of Tetraploid Nuclei in Rat Liver Cell During Postnatal Growth. J. Biophysic. Biochem. Cytol 3, 949-976 (1957).
29. Payne, J.T., Shaw, E.I.: A Radiation Effect from Low Doses of Tritiated Thymidine or X-rays. Radiation Res. 47, 123-142 (1971).
30. Pfeiffer, S.E., Tolmach, L.J.: Inhibition of DNA Synthesis in HeLa Cells by Hydroxyurea. Cancer Res. 27, 124-129 (1967).
31. Philips, F.S., Sternberg, S.S., Schwartz, H.S., Cronin, A.P., Sodergren, J.E., Vidal, P.M.: Hydroxyurea I. Acute Cell Death in Proliferating Tissues in Rats. Cancer Res. 27, 61-74 (1967).
32. Post, J., Hoffmann, J.: Dose-Dependent Effects of  $H^3$ -TdR as a DNA Label on the Replication of Liver Cells in the Growing Rat. Radiation Res. 26, 422-441 (1965).
33. Post, J., Hoffmann, J.: Late Effects of  $H^3$ -TdR as a DNA Label on Liver Cell Replication. Radiation Res. 30, 748-758 (1967).

34. Rabes, H.: Untersuchungen zur humoralen Regulation bei regenerativem und malignem Wachstum. Veröff. morph. Path. 73, 1-125 (1967).
35. Rabes, H., Tuczek, H.V.: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6, 302-312 (1970).
36. Rabes, H., Tuczek, H.V.: Zellproliferation in der partiell resezierten Rattenleber nach akuter Intoxikation durch Allylformiat. Beitr. Path. 143, 14-28 (1971).
37. Rabes, H., Wirsching, R., Tuczek, H.V.: Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie. Naturwissenschaften 59, 221-222 (1972).
38. Rabes, H., Iseler, G., Tuczek, H.V., Kerler, R.: Synchronized Liver Cells: A New Tool for Analysis of Cell-Cycle Dependent Carcinogen-Binding to DNA in vivo. Experientia 31, 686-687 (1975).
39. Rabes, H., Iseler, G., Tuczek, H.V.: Induced Cell-Cycle Synchrony of Hepatocytes after Partial Hepatectomy. Naturwissenschaften 62, 142 (1975).
40. Rajewsky, M.F.: Synchronisation in vivo: Kinetics of a Malignant Cell System Following Temporary Inhibition of DNA Synthesis with Hydroxyurea. Exp. Cell Res. 60, 269-276 (1970).
41. Rajewsky, M.F., Hülser, D.F., Fabricius, E.: Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen. Z. Krebsforsch. 76, 266-292 (1971).

42. Rajewsky, M.F.: Proliferative Parameters of Mammalian Cell Systems and their Rôle in Tumor Growth and Carcinogenesis. *Z. Krebsforsch.* 78, 12-30 (1972).
43. Rueckert, R.R., Mueller, G.S.: Studies on Unbalanced Growth in Tissue Culture I. Introduction and Consequences of Thymidine Deficiency. *Cancer Res.* 30, 1584-1591 (1960).
44. Rosenkranz, H.S., Carr, H.S.: Hydroxyurea and Escherichia Coli Nucleoside Diphosphate Reductase. *Cancer Res.* 30, 1926-1927 (1970).
45. Schiebel, W.: Charakterisierung einer löslichen DNA-Polymerase aus isolierten Kernen des synchron wachsenden Myxomyceten *Physarum Polycephalum*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chemie* 353, 753 (1972).
46. Schulze, B., Gerhard, H., Schump, E., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchungen über die Proliferation der Hepatocyten bei der Regeneration in der  $\text{CCl}_4$ -Leber der Maus. *Virchow Arch. Abt. B Zellpathol.* 14, 329-342 (1973).
47. Schwartz, H.S., Garofalo, M., Sternberg, S.S., Philips, F.S.: Hydroxyurea: Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Regenerating Liver of Rats. *Cancer Res.* 25, 1867-1870 (1965).
48. Sinclair, W.K.: Hydroxyurea: Differential Lethal Effects on Cultured Mammalian Cells during the Cell Cycle. *Science* 150, 1729-1731 (1965).
49. Sinclair, W.K.: Hydroxyurea: Effects on Chinese Hamster Cells Grown in Culture. *Cancer Res.* 27, 297-308 (1967).
50. Swarz, F.J.: Polyploidization of Liver after Partial Hepatectomy in the Dwarf Mouse and Hypophysectomized Rat: Effects of Extended Regenerative Periods. *Exp. Cell Res.* 48, 557-568 (1967).

51. Terasima, T., Tolmach, L.: Growth and Nucleic Acid Synthesis in Synchronously Dividing Populations of HeLa Cells. *Exp. Cell. Res.* 30, 344-362 (1963).
52. Tuzcek, H.V., Rabes, H.: Verlust der Proliferationsfähigkeit nach subtotaler Hepatektomie. *Experientia* 27, 526 (1971).
53. Vesco, D., Penman, S.: Purified Cytoplasmic DNA from HeLa Cells: Resistance to Inhibition by Hydroxyurea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 249-257 (1969).
54. Wheatley, D.N.: Binucleation in Mammalian Liver. *Exp. Cell. Res.* 74, 455-465 (1972).
55. Yarbrow, J.W., Niehaus, W.G., Barnum, C.P.: Effect of Hydroxyurea on Regenerating Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 592-597 (1965).
56. Yarbrow, J.W.: The Effect of Deoxyribonucleoside and Ribonucleoside Addition on the Inhibitory Effect of Hydroxyurea on Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *Biochem. J.* 104, 52c-54c (1967).
57. Yarbrow, J.W.: Further Studies on the Mechanism of Action of Hydroxyurea. *Cancer Res.* 28, 1082-1087 (1968).
58. Young, C.W., Hodas, S.: Hydroxyurea: Inhibitory Effect on DNA Metabolism. *Science* 146, 1172-1174 (1964).
59. Young, C.W., Schochetman, G., Karnofsky, A.D.: Hydroxyurea-induced Inhibition of Deoxyribonucleotide Synthesis: Studies in Intact Cells. *Cancer Res.* 27, 526-534 (1967).
60. Young, C.W., Schochetman, G., Hodas, S., Balis, M.E.: Inhibition of DNA Synthesis by Hydroxyurea: Structure-Activity Relationships. *Cancer Res.* 27, 535-540 (1967).

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rabes für die Aufgabenstellung sowie für die Geduld bei Diskussion und Lösung während der Arbeit aufgetretener Probleme. Herrn Dr. Tuczec vielen Dank insbesondere für die Mitentwicklung der Infusionstechnik und die Einweisung in die autoradiographische Auswertung. Herzlichen Dank auch Fräulein Kerler für ihre Mühe, mich in einen kleinen Teil der biochemischen Praxis einzuarbeiten und Fräulein Schülgen, mit der zusammen sie die medizinisch-technische Assistenz für diese Arbeit übernahm. Herr Hampe mit dem Atelier stellte sich freundlicherweise für die photo-technische Bearbeitung der Abbildungen zur Verfügung.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

## Lebenslauf

Am 31.12.1948 wurde ich, Gerd Iseler, als Sohn des Rechtspflegers Günther Iseler und dessen Ehefrau Marie-Luise, geb. Harsdorf in Einbeck geboren. Ostern 1954 wurde ich in die Sohnrey-Schule in Einbeck eingeschult. Nach den vier Grundschuljahren besuchte ich von Ostern 1958 an die Paul-Gerhardt-Schule in Dassel, von Ostern 1964 an die Goethe-Schule in Einbeck. Hier machte ich im Mai 1967 mein Abitur. Anschließend wurde ich zur Bundeswehr eingezogen und leistete die achtzehn Monate Grundwehrdienst bis Ende 1968 ab. Im SS 1969 und WS 1969/70 studierte ich an der Technischen Universität Hannover Chemie und Sport für das höhere Lehramt. Nach zwei vergeblichen Bewerbungen bekam ich für das SS 1970 einen Studienplatz der Medizin an der Universität in München. Nach dem WS 1970/71 machte ich hier die naturwissenschaftliche, im Anschluss an das SS 1972 die ärztliche Vorprüfung und im SS 1976 das Staatsexamen. Im August desselben Jahres heiratete ich meine Frau Jutta, geb. Pörner. Jetzt bin ich im Krankenhaus Geislingen/Steige als Medizinalassistent tätig.

Geislingen, im Dezember 1976







